

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
WIRKSAMKEIT UNTERSCHIEDLICH HERGESTELLTER
IMPFSTOFFE AUS INAKTIVIERTEM VIRUS GEGEN DIE
PSEUDOWUT BEIM KANINCHEN

Karin Aigner-Dünzl

1979

DISSERTATIONS- UND SCHNELLDRUCK GUREG-SYSTEM-SERVICE
8013 HAAR, ZUNFTSTRASSE 11, TELEFON (089) 46 04 179



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554611_0076

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr
Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRK-
SAMKEIT UNTERSCHIEDLICH HERGESTELLTER IMPF-
STOFFE AUS INAKTIVIERTEM VIRUS GEGEN DIE
PSEUDOWUT BEIM KANINCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Karin Aigner-Dünzl
aus
München

München 1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent: Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr
Korreferent: Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 23. Februar 1979



Meiner Mutter und Großmutter
in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	2
2.1. Begriffsbestimmung und Wesen der Pseudowut	2
2.2. Entwicklung, Dauer und Art der Immunität bei Pseudowut	4
2.2.1. Grundlagen	4
2.2.2. Zelluläre Immunität	5
2.2.3. Humorale Immunität	6
2.3. Aktive Schutzimpfung gegen die Pseudowut	8
2.3.1. Grundlagen	8
2.3.2. Lebendimpfstoffe gegen die Pseudowut	9
2.3.3. Pseudowutimpfstoffe aus inaktivierten Erregern	13
2.4. Wirksamkeitsprüfungen von Pseu- dowutimpfstoffen	19
2.4.1. Allgemeines	19
2.4.2. Wirksamkeitsprüfung am Schwein	21
2.4.2.1. Lebendimpfstoffe	21
2.4.2.2. Impfstoffe aus in- aktivierten Erre- gern	27

	Seite
2.4.3. Wirksamkeitsprüfung von Pseudowutimpfstoffen am Kaninchen	34
2.4.3.1. Lebendimpfstoffe	34
2.4.3.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern	35
2.4.4. Wirksamkeitsprüfung von Pseudowutimpfstoffen an Schafen und Rindern	38
2.4.4.1. Lebendimpfstoffe	38
2.4.4.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern	45
2.4.5. Wirksamkeitsprüfung von Pseudowutimpfstoffen am Fleischfresser	50
2.4.5.1. Lebendimpfstoffe	50
2.4.5.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern	51
2.5. Prüfung der Unschädlichkeit der Impfstoffe	53
2.5.1. Allgemeines	53
2.5.2. Kontrolle des Inaktivierungsvorganges	55
2.5.3. Kontrolle auf Kontamination mit Bakterien, Viren und Pilzen	56
2.5.4. Toxizitätskontrolle	58

	Seite
2.5.5. Unschädlichkeitsprüfung am Schwein	60
2.5.6. Unschädlichkeitsprüfung am Kaninchen	62
2.5.7. Unschädlichkeitsprüfung an Schafen und Rindern	63
2.6. Einsatz von Pseudowutimpfstoffen bei den verschiedenen Tieren	64
2.7. Passive Immunisierung gegen die Pseudowut	71
2.7.1. Natürliche passive Immunisierung	71
2.7.2. Künstliche passive Immunisierung	76
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	79
3.1. Material und Methoden	79
3.1.1. Zellkulturen	79
3.1.2. Virusstämme	81
3.1.3. Vaccinen	82
3.1.4. Tierversuche	85
3.1.5. Antikörpernachweis	86
3.2. Ergebnisse	88
3.2.1. Bedeutung des Adjuvans für die Wirksamkeit der Vaccinen	92
3.2.2. Einfluß des bei der Virusproduktion benutzten Zellsystems auf die Wirksamkeit der Vaccine	95

	Seite
3.2.3. Einfluß der Impfmenge und des Zeitabstandes zwischen 2. Impfung und Challenge	98
3.2.4. Beziehung zwischen Stärke der Belastungsinfektion und Wirksamkeit der Vaccinen	100
3.2.5. Vergleichende Auswertung aller getesteten Vaccinen bezüglich Wirksamkeit beim Kaninchen	102
4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	110
5. ZUSAMMENFASSUNG	115
6. LITERATURVERZEICHNIS	117
LEBENS LAUF	

1. Einleitung

Die Aujeszky'sche Krankheit (Pseudowut) gewinnt in Mittel- und Westeuropa eine immer größere Bedeutung. Die wirtschaftlichen Verluste, die vor allem in der Schweinezucht und -haltung durch die Pseudowut in zunehmendem Ausmaße auftreten, haben die Entwicklung wirksamer und unschädlicher Impfstoffe notwendig gemacht. Da die bisherigen Lebendvaccinen alle ein gewisses Risiko darstellen, steht die Entwicklung wirksamer Vaccinen aus inaktiviertem Virus derzeit im Vordergrund.

Bevor ein Impfstoff in Feldversuchen erprobt werden kann, muß er im Laboratorium auf Wirksamkeit und Unschädlichkeit geprüft werden. Hierfür sind geeignete Versuchstiere notwendig. Für die Prüfung von Aujeszky-Impfstoffen bietet sich das Kaninchen an. Es ist bisher auch häufig herangezogen worden, wobei man sich über die Eignung dieses Versuchstieres wegen seiner hohen Empfänglichkeit für das Pseudowutvirus aber noch durchaus nicht einig ist.

Aufgabe vorliegender Arbeit ist es, einmal die Eignung von Kaninchen für die Wirksamkeitsprüfung von Aujeszky-Impfstoffen erneut zu überprüfen und zum anderen die modernen Zellkulturimpfstoffe aus inaktiviertem Virus bezüglich Wirksamkeit am Kaninchen miteinander zu vergleichen. Als Maßstab dienten die Antikörperbildung und der Schutz vor einer Challenge-Infektion mit virulentem Virus. Der Ausgawert beider Testmethoden beziehungsweise der Grad ihrer Übereinstimmung war ein weiteres Anliegen der Arbeit.

2. Schrifttum

2.1. Begriffsbestimmung und Wesen der Pseudowut

Die Pseudowut ist eine akute, fieberhafte Virus-allgemeinrankheit mit bevorzugter Manifestation im Zentralnervensystem (ZNS) und einem sehr weiten Wirtsspektrum (Schwein, Rind, Schaf, Pferd, Hund, Katze, Ziege, Iltis, Dachs, Nerz, Wildschwein und Ratte). Der Mensch ist ebenfalls empfänglich (Zoonose) (30, 37). Neben zentralnervösen Störungen ist die Krankheit durch einen lokalen Juckreiz an der Eintrittspforte des Virus, der sich selten ausbreitet, besonders charakterisiert. Der Erreger gehört zu der Familie der Herpesviren. Er ist serologisch einheitlich. Im Kern befallener Zellen werden intranukleäre eosinophile Einschlusskörperchen gebildet (19). Die Pathogenese der Pseudowut ist noch nicht vollständig geklärt. Nach früherer Auffassung (12,29) breitet sich das Virus über die peripheren Nervenbahnen im Körper aus und erreicht so das ZNS. In letzter Zeit setzt sich mehr und mehr die Auffassung durch, daß es sich bei der Pseudowut um eine zyklische Infektionskrankheit mit einem zentralen Virämienstadium handelt (47). Die Entstehung der Virämie ist jedoch vom Stamm des betreffenden Virus abhängig (50). Möglicherweise kommen beide Pathogeneseformen vor.

Beim erwachsenen Schwein kann die pathogenetische Ereigniskette nur bis zur virämischen Phase führen,

ohne daß es zu einem Befall des ZNS kommt. Diese Tiere erkranken kaum, scheiden aber den Erreger aus. Sie stellen ein wichtiges Erregerreservoir dar. Bei anderen Tierarten und beim Ferkel führt die Virämie zur Generalisierung mit bevorzugter Manifestation im ZNS. Als Folge kommt es zu zentralnervösen Störungen, die durch eine nichteitrige Enzephalitis (82) charakterisiert sind und deren Schwere mit der Länge der Krankheit parallel verläuft (59). Als "primäraffines Organ" gilt das lymphoreticuläre Bindegewebe, speziell die Tonsillen (2,46,63). Neben dem ZNS können auch andere Organe, vor allem die Lunge befallen werden. Eine Lungenmanifestation tritt fast regelmäßig beim Ferkel auf und äußert sich als entzündliches Lungenödem (7,57).

Die Pseudowut belastet durch eine hohe Sterblichkeit bei Saug- und Absatzferkel die Schweinehaltung (7,17,24,30,59,72).

2.2. Entwicklung, Dauer und Art der Immunität bei Pseudowut

2.2.1. Grundlagen

Tiere, die die Pseudowut überleben, sind über eine bestimmte Zeit gegenüber einer Reinfektion immun (75). Die Zeitdauer schwankt in erheblichen Grenzen. Die Immunitätsbildung bei Pseudowut ist außerordentlich kompliziert. Wie bei den meisten Herpesinfektionen sind daran nicht nur spezifische Mechanismen, wie Immunzellen und Antikörper, sondern auch unspezifische Abwehrvorgänge beteiligt. Von diesen Antigen-unspezifischen Abwehrvorgängen besitzen die größte Bedeutung Interferonbildung (42), Makrophagen und humorale Resistenzfaktoren, wie zum Beispiel Komplement. Das Zusammenwirken dieser einzelnen Aktivitäten bei der Ausbildung einer Immunität gegen die Pseudowut ist noch relativ unbekannt. Die Beziehung zwischen Antikörperaktivität und Komplement ist gut im Neutralisationstest darstellbar: Ein Zusatz von 5% Komplement führt zu einer signifikanten Erhöhung der Neutralisationswerte. Die spezifische Immunität gegen die Pseudowut beruht auf der Bildung von zellulären und humoralen Vorgängen.

2.2.2. Zelluläre Immunität

Die Träger der zellulären Immunität sind die über T-Lymphozyten entstehenden Immunzellen (vor allem die Effektorzellen und Killerzellen). Sie entstehen nach Wittmann et al. (85) vornehmlich aus den Lymphknoten und der Milz, weniger aus Thymus und Blut. Knochenmarkszellen sind daran nicht beteiligt. Lymphozyten infizierter Schweine sind in der Lage, in Gegenwart von löslichem Aujeszky-Virus-Antigen die Motilität von Makrophagen zu ändern. Bei Blut- und Thymuslymphozyten tritt diese Reaktion am 4. Tag nach der Infektion auf (84). Die zelluläre Immunität entwickelt sich vor der humoralen und läßt sich etwa 4 Tage post inf. erstmals nachweisen und ist bis zum 7. Tag vollständig ausgebildet. Eine experimentelle Wiederholungsinfektion bewirkt keine weitere Steigerung. Über die Dauer der zellulären Immunität gehen die Meinungen auseinander. Nach Sabó und Blaškovič (63) ist die lokale Resistenz der Tonsillen und der Rachenschleimhaut auf ca. 3 Monate begrenzt.

2.2.3. Humorale Immunität

Die humorale Immunität beruht auf der Bildung von neutralisierenden Antikörpern. Sie erscheinen erstmals 7 Tage post inf. und erreichen nach etwa 14 Tagen optimale Titer. Sie können ohne Titerabfall bis zu 18 Monaten persistieren. Zwischen der Höhe des Titers der neutralisierenden Antikörper und dem Immunschutz besteht keine direkte Korrelation.

Neben neutralisierenden Antikörpern erscheinen in der Blutbahn auch komplementbindende, die im Vergleich zu den neutralisierenden früher einsetzen und höhere Titer erreichen (74) und präzipitierende Antikörper. Letztere werden 1 - 2 Wochen nach den neutralisierenden gebildet und verschwinden wesentlich schneller aus der Blutbahn. Auf eine Reinfektion reagiert das humorale System mit einem typischen Boostereffekt. Allerdings scheint die Bildung der neutralisierenden Antikörper auch sehr variabel zu sein. Sabó und Grunert (64) fanden 3 Monate nach einem Pseudowutausbruch etwa bei der Hälfte der Schweine neutralisierende Antikörper, 6 Monate später reagierten 92,6% der Tiere positiv. Beim Schwein wird den neutralisierenden Antikörpern pathogenetisch insofern eine wichtige Funktion zugeschrieben, weil sie ab einer bestimmten Konzentration die Einschleusung des Virus über die Blutbahn ins ZNS verhindern können.

Sauen können neutralisierende Antikörper via Kolostrum auf die neugeborenen Ferkel übertragen (51). Die passive maternale Immunität schützt Ferkel zwar gegen letale Infektionen, kann aber klinische Symptome nicht immer vollständig verhindern. Auch nach künstlicher Immunisierung über eine Schutzimpfung werden die mütterlichen Antikörper über das Kolostrum übertragen und vermitteln den Ferkeln einen kurzdauernden Schutz (91). Unter Feldbedingungen erkrankten Ferkel von durchseuchten Sauen zu etwa 27% und von nicht durchseuchten zu etwa 100%.

2.3. Aktive Schutzimpfung gegen die Pseudowut

2.3.1. Grundlagen

Es sind Lebendimpfstoffe und Impfstoffe aus inaktivierten Erregern entwickelt worden. Bis vor kurzer Zeit gestand man nur den Lebendimpfstoffen eine ausreichende Wirksamkeit zu. Nach einer Schutzimpfung mit Lebendimpfstoffen entwickelt sich sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunität, die beide für einen Schutz gegen die Pseudowut wichtig sind.

Die Grundlage von Lebendimpfstoffen bilden künstlich attenuierte Pseudowutvirusstämme, die ihre Virulenz für das Schwein weitgehend eingebüßt haben, ohne jedoch ihre immunisierenden Eigenschaften dabei zu verlieren.

In jüngster Zeit sind auch wirksame Impfstoffe aus inaktivierten Erregern entwickelt worden.

2.3.2. Lebendimpfstoffe gegen die Pseudowut

Einen großen Vorteil für die Vaccineherstellung bedeutet die Viruszüchtung in Zellkulturen, hauptsächlich in Hühnerembryofibroblasten (FHE) und in Schweinenierenzellen (38,62,77). Bartha und Kojnok (6) stellten als erste eine verträgliche Lebendvaccine her, die den sogenannten "K"-Stamm als Grundlage hat. Dieser genetisch stabile Virusstamm wurde über eine Plaqueklonisierung aus mit Feldvirus infizierten Schweinenierenzellkulturen gewonnen (5). Er besitzt eine verminderte Virulenz für Kaninchen, ist gegenüber Schweinen, Rindern und Schafen avirulent und zeichnet sich durch eine geringe Cytopathogenität und kleine Plaques aus. Die Vermehrung des Virusstammes zum Zwecke der Impfstoffherstellung wird in FHE-Zellkulturen durchgeführt. Lebendimpfstoffe, deren Basis das Impfvirus "K" ist, sollen nicht für Hunde verwendet werden (83).

Škoda (68) attenuierte verschiedene Pseudowut-Virusfeldstämme in FHE-Kulturen (Virus aus Organen verwendeter Tiere) mittels Passagen. Im Verlaufe der Zellkulturpassagen erhielt er einen modifizierten Virusstamm (Bezeichnung Bukarest "BUK"). Der Stamm Bukarest führt in FHE-Zellen zu einer schnellen Zelldegeneration, bildet große Plaques, besitzt eine hohe Infektiosität und tötet intramuskulär (i.m.) geimpfte Kaninchen ohne Anzeichen von Juckreiz (70).

Žuffa und Grigelová (97) bezeichnen die rundzellige Degeneration von Schweinenierenzellen und den Tod von Kaninchen ohne vorangegangenen Pruritus als charakteristisch für alle bisher untersuchten modifizierten Aujeszky-Virusstämme.

Nach Žuffa (92) kommt es bei steigender Passagenzahl in FHE-Kulturen zu einer Verminderung der Immunogenität. Die Bildung neutralisierender Antikörper nimmt ab und es werden zunehmend größere Virusdosen für eine humorale Immunantwort benötigt. Die Fähigkeit der Kontaktübertragung von geimpften auf nichtgeimpfte Tiere geht dabei verloren.

Die Möglichkeit eine einheitliche Vaccine aus dem Stamm "BUK" für alle in Frage kommenden Tierarten zu gewinnen, hält Žuffa (92) für ungünstig, da z.B. bei Schweinen eine relativ hohe Impfdosis benötigt wird, um eine Antikörperbildung zu erzeugen, diese jedoch bei anderen Tierarten Impferkrankungen erzeugen kann. Es werden deshalb zur Gewinnung von Lebendimpfstoffen für andere Tierarten andere Methoden für eine Virusattenuierung vorgeschlagen (87,88). Über eine dreifache Plaquereinigung - ausgehend von der 800. Gewebekulturpassage - gelang es Žuffa und Dlhý (96) 6 Viruslinien zu isolieren, von denen sich eine für Schafe nach weiteren 40 Passagen in FHE-Kulturen (Medium Earle) als unschädlich erwies (93). Dieser Impfvirusstamm, BUK-TK-300/9,2 genannt, wurde dann mit gutem Erfolg zur Impfung von Schafen eingesetzt.

Die Virulenz und Verteilung zweier Pseudowut-Impfstämme, nämlich Stamm "BUK" 624 und Stamm "TK" 900 wurde an 88 Tage alten Schweinefeten überprüft. Die Mehrzahl der mit dem Impfvirus "TK" 900 infizierten Feten überlebte die Infektion. Das Virus war 14 Tage post inf. nur noch aus der Amnionsflüssigkeit und bei Kontakt-infizierten Feten aus der Leber, Lunge und dem Blut, aber niemals aus dem ZNS isolierbar. Feten hingegen, die mit dem Impfvirus "BUK" 624 infiziert wurden, starben in der Mehrzahl und beherbergten 14 Tage post inf. das Virus in allen Organen, 21 Tage post inf. nur noch im ZNS. Neutralisierende Antikörper mit signifikantem Titer waren nur bei den Feten, die mit mindestens 10^4 KID₅₀/ml des Impfstammes "TK" 900 infiziert waren nachweisbar (36).

Über das Verhalten des Impfvirus "BUK" der 622. FHE-Passage im Schwein liegen Angaben von Jamrichová und Škoda (35) vor. Das Impfvirus ließ sich regelmäßig 2 - 8 Tage post vacc. an der Inokulationsstelle und in den regionalen Lymphknoten, bei 18% der vaccinierten Schweine auch aus dem ZNS nachweisen. Ähnliche Befunde erhielten sie bei dem Virusstamm "TK" 200, der aus dem Stamm "BUK" hervorgegangen ist.

Suhaci et al. (79) passagierten ebenfalls den avianisierten Pseudowut-Virusstamm "BUK" in FHE-Zellen, stellten nach der 250. Passage einen Virulenzverlust für Schweine nach i.c. Applikation und fehlenden Pruritus für Kaninchen fest und erhielten nach 300 Passagen ein für Schafe, Hunde und Katzen avirulentes

und immunisierendes Impfvirus. Diese abgeschwächte Viruslinie konnte nur durch die Selektion avirulenter oder schwach virulenter Partikel mit Hilfe des Endverdünnungsverfahrens gewonnen werden.

Die Möglichkeit einer Kombinationsimpfung gegen die Aujeszky'sche Krankheit und den Botulismus wiesen an Versuchen mit Meerschweinchen und Nerzen Žuffa et al. (95) auf. Die Kombination der beiden Vaccinen stimulierte einen höheren Antikörpertiter als bei einzelner Verabreichung. Die Verfasser führen dies auf das in der Botulismuvaccine enthaltene $\text{Al}(\text{OH})_3$ zurück. Der Impfstoff gegen die Pseudowut basiert auf dem Impfvirusstamm "BUK"-TK 300/9,2.

2.3.3. Pseudowutimpfstoffe aus inaktivierten Erregern

Die ersten Immunisierungsversuche bei Kaninchen sowohl mit Vaccinen aus Organsuspensionen als auch aus Gewebekulturen, beide mit Formalin inaktiviert, schlugen fehl (40,44). Später konnte zwar mit einer Formalinvaccine eine ausreichende Immunogenität für kleine Labortiere - Mäuse, Meerschweinchen und Kaninchen - nachgewiesen werden, sie reichte aber nicht für das Schwein aus (89). Airapetyan et al. (1) stellten einen Impfstoff her, bei dem das Virus, das in Kaninchennieren-Zellkulturen gezüchtet wurde mit 0,05 % Formalin inaktiviert und an $\text{Al}(\text{OH})_3$ adsorbiert wurde. Er erwies sich für Kaninchen und weiße Mäuse unschädlich und für Schafe und Schweine wirksam.

Die Wirksamkeit einer Formalinadsorbatvaccine mit Saponin als Adjuvans für Schweine wurde auch in Italien bestätigt (25).

Vaccinen, die mit HNO_2 (32) oder mit Wärme in Anwesenheit von MgCl_2 (98) inaktiviert wurden, brachten nur z.T. befriedigende Ergebnisse.

Untersuchungen über den Einfluß von ionisierenden Strahlen, speziell von Gamma-Strahlen, auf das Aujeszky-Virus beweisen, daß sich das Aujeszky-Virus mit Strahlen inaktivieren läßt,

daß der Erhalt seiner immunisierenden Eigenschaften aber sehr von der Strahlendosis abhängt (22,23).

Versuche mit einer über UV-Licht inaktivierten Vaccine führten bei Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen zu einem guten Immunschutz (8,89), konnten aber bei Schweinen keine Antikörperbildung stimulieren (89).

Die Inaktivierung von Pseudowutvirus ist sowohl von der Strahlendosis als auch vom Infektiositätstitel des betreffenden Virusmaterials abhängig. Die Verkleinerung der Plaquegröße nach der Bestrahlung ist nicht dauerhaft. Bei einigen Virusstämmen besteht außerdem die Gefahr einer Resistenz gegen die UV-Bestrahlung nach ihrer serienmäßigen Durchführung. Außerdem üben Substanzen wie Phenolrot und Blutserum, die das gleiche Spektrum der UV-Strahlenabsorption wie das Virus haben, einen hemmenden Einfluß bei der Virusinaktivierung aus (21).

Gute Ergebnisse hingegen konnten Haralambiev et al. (28) bei Schafen, Rindern und Schweinen mit einer Vaccine, in der das Virus auf FHE-Zellen gezüchtet und mit Äthanol inaktiviert war, erzielen. Sie mischten filtrierte Virus (Titer $10^7 - 10^8$ KID₅₀) im Verhältnis 3 : 1,25 mit neutralem Glyzerin (bezogen auf 85 ml) und setzten je 1,5 g NaCl und bibasisches Na₃ PO₄ zu.

Die Inaktivierung wurde mit 1/4 absolutem Alkohol und 1/6 flüssigem Paraffin (bezogen auf die Virusmenge) bei + 30° C über 20 Stunden vorgenommen. Die von Haralambiev et al. (28) bei Schafen und Rindern erzielten Ergebnisse wurden später auch bei Schweinen von Simeonov et al. (67) bestätigt. Bei diesen Versuchen erwies sich 0,2% Saponin als wirksameres Adjuvans als Paraffin.

Osdize und Nochevnyi (58) stellten aus dem attenuierten Aujeszky-Virusstamm "BUK" eine Vaccine her, die mit 15% Äthanol über 20 Stunden bei + 30° C inaktiviert wurde und als Adjuvans Al (OH)₃ enthielt. Ihre Wirksamkeit wurde an Schafen bestätigt.

Borgen und Espensen (14) entwickelten einen Impfstoff, in dem das Virus mit sichtbarem Licht und Methylenblau inaktiviert wurde (Photoinaktivierung). Eine Impfung mit dieser Vaccine empfehlen die Verfasser für trächtige Sauen, weil hierdurch die neugeborenen Ferkel über kolostrale Antikörper geschützt werden.

Weiterhin sind Pseudowutimpfstoffe über eine Inaktivierung des Virus mit Saponin (10,11,17,53), mit Kristallviolett (53,54,55) und mit Betapropiolakton (26,53) entwickelt worden.

Nedjalkov et al. (53) untersuchten vergleichend Vaccinen dieser Art auf ihre Immunogenität. Die Kristallviolett- und Betapropiolaktonvaccinen wurden folgendermaßen hergestellt:

Gleiche Teile des Virusstammes "BUK", der nach 210 Passagen in Hühnerembryonen in weiteren 56 FHE-Passagen gezüchtet wurde und $\text{Al}(\text{OH})_3$ werden gemischt, 30 Minuten lang geschüttelt und anschließend mit einem 20%igen Zusatz einer 0,1 - 0,2%igen Kristallviolettlösung in Glyzerin bzw. einem Zusatz von 0,03 - 0,2%igen Betapropiolakton inaktiviert. Die Inaktivierung erfolgt über 4 Tage bei $+ 4^\circ \text{C}$.

Bei der Herstellung der Saponin vaccine wurden 20 ml desselben Virusstammes mit je 35 ml physiologischer NaCl-Lösung und $\text{Al}(\text{OH})_3$ und mit 10 ml gesättigter Glukoselösung gemischt und anschließend mit 0,3% Saponin versetzt. Der Inaktivierungsvorgang läuft wie oben ab.

Die Adsorbatkristallviolett vaccine war auch bei 10 Tage alten Saugferkeln wirksam (55).

Die Kombination einer Pseudowutkristallviolett vaccine mit einer Schweinepestkristallviolett vaccine brachte vor allem in Bezug auf die Pseudowut gute Ergebnisse (54).

Škoda und Wittmann (76) inaktivierten Pseudowutvirus mit Äthyläthylenimin (EEI) in einer Konzentration von 0,15%. Als Adjuvans benutzten sie Diäthylaminoäthyl-Dextran (DEAE - D). Dieser Impfstoff war auch für Schweine und Kälber (34) unschädlich und wirksam. 1977 wurde der Inaktivierungsmodus abgewandelt. Man (86) benutzte nun anstelle von EEI-Äthylenimin(EI), das billiger und vor allem leichter zu beschaffen ist. Für die Inaktivierung setzte man dem

Virus 0,15% EI einer 2%igen Stammlösung zu und hielt das Gemisch 16 Stunden bei + 37° C. Die Neutralisation des EI erfolgte mit 20%iger Natriumthiosulfatlösung im Verhältnis 10 : 1.

Delagneau et al. (20) entwickelten eine Pseudowutvaccine, bei der das Virus mit 0,02% Glutaraldehyd bei + 37° C über 2 Stunden inaktiviert wurde. Als Adjuvantien dienten Mannitolmonofoleat und Natriumäthylmercuritthiosalicylat. Im Vergleich zu den anderen Vaccinen aus inaktiviertem Virus schnitt dieser Impfstoff bezüglich Wirksamkeit und Unschädlichkeit bei Kaninchen und Ferkel bisher am besten ab.

Vergleichende Untersuchungen von Vaccinen mit verschiedenen Adjuvantien unterstrichen die Ergebnisse, die mit diesen öligen Adjuvantien erreicht wurden (20).

Die Untersuchungen von Skoda, Wittmann, Jakubik und Delagneau der Jahre 1970 - 1977 haben bewiesen, daß es durchaus möglich ist, den bisherigen Lebendimpfstoffen bezüglich Wirksamkeit beim Schwein und Ferkel vergleichbare Impfstoffe aus inaktiviertem Virus gegenüberzustellen. Da Impfstoffe aus inaktiviertem Virus, was die Unschädlichkeit betrifft, den Lebendimpfstoffen überlegen sind, gehört die zukünftige Entwicklung von Pseudowutvaccinen zweifelsohne den Impfstoffen aus inaktiviertem Virus. Voraussetzung für die Herstellung wirksamer Vaccinen aus inaktiviertem Virus sind nach allen bisherigen Erfahrungen:

1. Virusmenge pro Impfstoffdosis,
2. Zellart in der das Virus vermehrt wurde,
3. Art des Inaktivierungsmittels,
4. Art des Adjuvans bzw. Adsorbens.

Die Züchtung von Aujeszky-Virus in Zellkulturen ermöglicht es, große Virusmengen in gereinigter Form in vitro im Laboratorium herzustellen. Wichtig ist dabei allerdings das für die Virusproduktion benutzte Zellsystem, da es erheblichen Einfluß auf die Immunogenität des Virus hat. Von ebenso großer Bedeutung für die Wirksamkeit der Vaccine ist das benutzte Adjuvans. Auch die Art der Applikation des Impfstoffes und der Testinfektion ist von erheblicher Bedeutung. Eine intramuskuläre (i.m.) Impfung hat bei einer parenteral durchgeführten Testinfektion eine größere Wirksamkeit als eine intranasal (i.n.) durchgeführte. Erfolgt die Challenge-Infektion hingegen i.n., sind beide Applikationsformen gleich wirksam. Die Wirksamkeit einer Impfung, die per inhalationem durchgeführt wurde, ist in jedem Fall den anderen Darreichungsformen als unterlegen zu betrachten, da dabei zumindest bei Mäusen keine neutralisierenden Antikörper nachzuweisen waren (56).

Alle Pseudowutvaccinen aus inaktiviertem Virus sind belastet durch die kurze Dauer der Impfmunität. Entsprechende Boosterimpfungen in bestimmten Zeitabständen sind deshalb notwendig. Hierfür wurden in der letzten Zeit Impfprogramme aufgestellt, welche die trächtigen Sauen und die Ferkel ab einem bestimmten Alter einschließen.

Mit den neuen Zellkulturvaccinen aus inaktiviertem Virus ist es möglich, auch andere, für das Aujeszky-Virus empfängliche Tiere zu impfen. Diese Versuche stehen noch am Anfang.

2.4. Wirksamkeitsprüfung von Pseudowutimpfstoffen

2.4.1. Allgemeines

Bei der Wirksamkeitsprüfung muß man unterscheiden:

1. Wirksamkeitsprüfung im kontrollierbaren Experiment und
2. Wirksamkeitsprüfung unter Feldbedingungen.

Die Wirksamkeitsprüfung im Experiment wird im Versuchstier durchgeführt und beruht auf 2 Kriterien:

1. Immunität der Versuchstiere gegenüber einer Challenge-Infektion mit virulentem Virus,
2. Nachweis der Bildung von spezifischen Serumantikörpern als Folge der Schutzimpfung.

Als Versuchstiere hat man zu Wirksamkeitsprüfungen von Aujeszky-Impfstoffen bisher herangezogen:

1. Schweine,
2. Kaninchen,
3. Schafe und Rinder,
4. Fleischfresser.

Für die Beurteilung der Ergebnisse ist dabei wichtig, daß diese Tiere für das Aujeszky-Virus ganz unterschiedlich empfänglich sind. Als Challenge-Virus wird in der Regel virulentes Feldvirus benutzt, das auf einen Virusgehalt eingestellt wird, der bei den Kontrolltieren sicher zum Tode führt. Dabei muß man unterscheiden, ob der Challenge-Virusstamm zum Impfstoffvirusstamm homolog oder heterolog ist.

Zum Antikörpernachweis wird gewöhnlich der Neutralisationstest verwendet. Auch Komplementbindungsreaktion (74), Präzipitationsreaktion und Immunofluoreszenz-Verfahren (65) sind erprobt worden.

Unter Feldbedingungen wird die Wirksamkeit im Rahmen einer laufenden Seuche durch den Antikörpernachweis und durch Immunität gegenüber neu eingeschleppten Seuchen kontrolliert.

Neben diesen Prüfungen des fertigen Impfstoffes wird die Wirksamkeit während des Herstellungsverfahrens der Vaccine dadurch überwacht, daß bestimmte Bedingungen bei der Produktion eingehalten werden.

Sie betreffen

1. den Virusausgangsgehalt pro Impfdosis,
2. Art des Virus und des Vermehrungssystems (z.B. Art der Zellkultur),
3. Art der Reinigung,
4. Art der Inaktivierungskinetik,
5. Neutralisation des Inaktivierungsmittels,
6. Zusätze (Adjuvantien, Adsorbentien, Entschäumer, Konservierungsmittel usw.),
7. Art der Abfüllung und Lagerung,
8. Art des Versandes.

2.4.2. Wirksamkeitsprüfung am Schwein

2.4.2.1. Lebendimpfstoffe

Lebendimpfstoffe auf der Basis des "K"-Stammes schützen geimpfte Schweine vor einem intratracheal (i.t.) und i.n. durchgeführten Challenge mit 0,5 ml eines zum Impfvirus heterologen Virus über das keine weiteren Angaben gemacht wurden. Allerdings zeigten die Impflinge auf die Belastungsinfektion hin Erkrankungssymptome des respiratorischen Systems, Appetitlosigkeit und allgemeine Schwäche. Diese Krankheitssymptome traten zwei Tage nach der Testinfektion auf und erstreckten sich über etwa drei Tage. Sie waren bei den Tieren, die i.m. geimpft waren stärker ausgeprägt als bei i.n. geimpften (6,52). Ungeimpfte Tiere starben bis auf eine Ausnahme. Krankheitssymptome wie oben beschrieben kamen bei einem anderen Versuch nur bei einmal geimpften Schweinen vor. Nach der zweiten i.m. Impfung mit 2 ml beobachtete man bei den Impflingen auf die i.t. Belastungsinfektion (3 Wochen nach der Impfung) nur Temperaturerhöhungen, während sämtliche ungeimpften Kontrolltiere auf diese Infektion hin starben. Neutralisierende Antikörper waren erst bei der Revaccination nachweisbar (1 : 32) (6). Ein Unterschied zwischen dem i.m. und i.n. Impfmodus zeigte sich fernerhin in der sehr geringen Ausscheidung des Impfvirus bei der i.n. Applikation (52). Mit 1 ml (Vaccinetiter $10^{6,5}$ KID₅₀/0,5 ml) i.m. geimpfte Tiere wurden 36 Tage post vacc. und i.n. geimpfte 21 Tage nach der Impfung einer Challenge-Infektion

unterworfen. In beiden Fällen wurden 0,5 ml des Challenge-Virus (Titer $10^{6,5}$ KID₅₀/0,5 ml), das bei einem Ausbruch der Seuche isoliert wurde, i.n. verabreicht. Die Antikörpertiter lagen nach der ersten Impfung bei 1 : 4 und nach der Revaccination bei 1 : 32 (52).

In den Niederlanden führte man eine Wirksamkeitsprüfung nach folgenden Gesichtspunkten durch: Hier wurde die s.c. Applikation zweimal im Abstand von 3 - 4 Wochen mit 1 ml Vaccine angewandt und nach weiteren 2 Wochen eine i.n. Belastungsinfektion mit $2 \times 10^{5,8}$ KID₅₀ eines virulenten Feldvirus vorgenommen. Der Nachweis neutralisierender Antikörper gelang zu 77%. Sie lagen nach der ersten Impfung zwischen negativ und 1 : 12 und stiegen nach der Revaccinierung bis 1 : 24 an. Diese Wirksamkeitsprüfung wurde an tragenden, an nichttragenden Sauen, an Mastschweinen und an Ferkeln geimpfter Muttertiere durchgeführt. Die Saugferkel wurden ebenfalls serologisch untersucht und wiesen drei- bis vierundzwanzig Tage post part. neutralisierende Antikörper auf. Einer i.n. durchgeführten Challenge-Infektion widerstanden sie im Gegensatz zu nichtgeimpften Kontrollferkeln (4).

Bezüglich der Produktion neutralisierender Antikörper weisen alle erwähnten Autoren darauf hin, daß eine einzige Impfung keine bis niedrige Titer hervorruft, deren Höhe nach der zweiten Impfung zunimmt.

Allerdings ist die Höhe der Neutralisationstiter nicht unbedingt für den Immunstatus der Impflinge entscheidend, denn Mc Ferran und Dow (52) haben bei einem von ihnen durchgeführten Feldversuch eine einzige s.c. Impfung mit 1 ml als durchaus wirksam bezeichnet. Dies läßt sich dadurch erklären, daß bei einer natürlichen Infektion im Gegensatz zur experimentell durchgeführten Testinfektion, deren Virusgehalt und -titer genau festgelegt ist, die Menge und Infektiosität des aufgenommenen Virus nicht so groß ist.

Auch Bartha und Kojnok (6) stellten bei ihren Feldversuchen fest, daß in stark verseuchten Beständen mit einer jährlichen Impfung die Pseudowut ausgerottet werden könnte und bei einer Notimpfung auch in nicht geimpften Beständen die Seuche innerhalb von 10 Tagen gestoppt werden könnte.

Lebendvaccinen, deren Grundlage das avianisierte Impfvirus "BUK" in verschiedenen Zellkulturpassagen (250., 251., 311., 478., 620.) ist, stimulierten nach s.c., i.m., i.t., i.c. Applikation mit 0,5 ml - 10 ml (über den Titer des Impfvirusstammes wurden keine näheren Angaben gemacht) neutralisierende Antikörper in unterschiedlicher Höhe (17,71,79). Einen 100%igen Schutz vor einer i.n. durchgeführten Belastungsinfektion erzielten Bran et al. (17) bei revaccinierten und einen 96%igen Schutz bei einmal geimpften Tieren. Ferkel wurden mit 1 ml s.c. der Vaccine (Titer $10^5 - 10^6$ KID₅₀/ml) geimpft, z.T. nach 15 Tagen mit der gleichen Dosis revacciniert

und zwischen 18 - 54 Tagen nach der Impfung (revaccinierte 21 Tage nach der zweiten Impfung) mit 2 ml virulentem Virus (Titer 10^6 KID₅₀/ml) i.n. belastet. Der Neutralisationsindex (NI) (die Differenz der Ergebnisse - in Logarithmen ausgedrückt - der Virustitration und der Titration der Virus-Serum-Gemische) betrug nach einer Impfung 1,1 und nach der Revaccination 4,27 (17). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Škoda et al. (71). Sie führten eine i.t. Challenge-Infektion (Titer des Challengevirus 1×10^5 - 5×10^7 KID₅₀/ml) an zweimal im Abstand von 18 - 38 Tagen immunisierten Schweinen durch. Diese Belastungsinfektion überlebten auch Saugferkel immunisierter Muttertiere reaktionslos. Neutralisierende Antikörper traten bei den Impflingen zwischen dem 10. und 21. Tag post vacc. in einer Höhe von 1 : 8 auf und erreichten ihren Höhepunkt 49 Tage post vacc. mit Titern von 1 : 8 bis 1 : 64. Nach der Revaccination erreichten sie Werte von 1 : 256 bis 1 : 512. In diesem Versuch wurde auch auf intracerebralem Wege testinfiziert. Diese Applikationsform führte trotz hoher neutralisierender Antikörper stets zum Tode. Da aber eine i.c. Durchführung eine wesentlich höhere Belastungsform darstellt, spricht dies nicht gegen die Wirksamkeit dieser Vaccine.

Der immunogene Wert einer Vaccine (Titer $10^{5,5}$ KID₅₀/ml) für Ferkel (Alter 1 Monat), deren Grundlage die 387. Passage auf der Chorionallantoismembran (CAM) und weitere 250-251 Passagen auf FHE-Zellen des Virusstammes "BUK" war, kann nur anhand des Anstiegs der neutralisierenden Antikörper bewertet werden, da die i.n.

durchgeführte Testinfektion auch bei nicht geimpften Kontrolltieren keine klinischen Krankheitserscheinungen hervorrief. Die Impfung wurde zweimal innerhalb von 21 Tagen vorgenommen, wobei ein Teil der Tiere die Vaccine 1 : 5 und ein anderer Teil 1 : 10 verdünnt erhielt. Die Titer der neutralisierenden Antikörper betrugen für beide Gruppen nach der ersten Impfung 1 : 2 bis 1 : 16 und stiegen nach der Revaccination auf 1 : 32. Nach einer weiteren Passage des Impfvirus auf FHE-Zellen stiegen die Serumtiter nach der ersten Impfung auf 1 : 32 und nach der Boosterimpfung auf 1 : 64. Das Alter dieser Versuchstiere betrug 2 Monate (79).

Versuche, in denen Schweine per Aerosol geimpft wurden, bewiesen anhand einer reaktionslos überstandenen Challenge-Infektion die Wirksamkeit dieses Impfvirusstammes (31).

Feldversuche mit diesen Impfstoffen wurden verschiedentlich durchgeführt und bestätigten die experimentellen Ergebnisse (69). In einem Fall wurde ein an $\text{Al}(\text{OH})_3$ adsorbierter Impfstoff 3 Jahre lang getestet und für Ferkel ab 8 Tage als wirksam befunden (15). Vaccinen ohne Zusätze waren ebenso wirksam - von 92 geimpften Betrieben traten z.B. nur in 5 Betrieben Neuausbrüche auf, wobei aber in 3 Fällen die Seuche bei neu eingestellten, nicht geimpften Tieren ausbrach (69).

Bei einem in den USA durchgeführten Wirksamkeitstest wurde ein Impfstoff verwendet, in dem das Virus auf Schweinenierenzellen adaptiert war. Auch in diesem Fall wurden 2 Versuchsgruppen gebildet. Die eine Gruppe wurde mit 1 ml der Vaccine i.m. geimpft und nach 3 Wochen i.n. mit virulentem Virus belastet. Diese Tiere hatten vor der Challenge-Infektion Antikörpertiter bis 1 : 64. Der zweite Versuch wurde nach dem gleichen Schema durchgeführt, nur betrug die Vaccinedosis weniger als 1/10 der vorherigen. Diese Tiere wiesen Titer von 1 : 17 auf. Daraufhin wurden in einem Feldversuch mehr als 3000 Tiere geimpft und die Wirksamkeit des Impfstoffes, der bereits bei Ferkeln ab 3 Lebenstagen eingesetzt werden kann, bestätigt. Der Impfschutz erstreckte sich auf 6 Monate (81).

2.4.2.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern

Wirksamkeitsprüfungen an erwachsenen Schweinen wurden mit zwei Vaccinen (IV und V), die beide mit EEI inaktiviert wurden und deren Titer vor der Inaktivierung bei Vaccine IV mit 1×10^7 PFU_{0,1/ml} und für Vaccine V mit 5×10^7 PFU_{0,1/ml} angegeben wurde, durchgeführt. In jeder Gruppe wurde jeweils die Hälfte der Tiere s.c. bzw. i.m. mit 10 ml geimpft und davon wiederum 50% jeder Gruppe mit der gleichen Dosis 28 Tage später revacciniert. 3 Wochen post vacc. lagen die Titer der neutralisierenden Antikörper zwischen negativ und 1 : 16. Nach der Revaccination erreichten sie Werte bis 1 : 32. Mit Vaccine V geimpfte Tiere wurden 85 bzw. 137 Tage (revaccinierte) post vacc. mit 5×10^3 PFU virulentem Virus des Stammes Phylaxia i.c. belastet. Bei Versuchsgruppe IV wurde die Challenge-Infektion 108 bzw. 217 Tage nach der ersten Impfung mit 1×10^3 PFU vorgenommen. Zwischen der Wirksamkeit der beiden Vaccinen war kein nennenswerter Unterschied. Die Revaccination brachte keine deutliche Steigerung der Immunität. Insgesamt überlebten von 30 geimpften Tieren 19 (die mit Vaccine IV revaccinierte Gruppe konnte auf Grund einer unbeabsichtigten Pseudowutinfektion nicht mehr herangezogen werden). Dies entspricht einer Schutzquote von ca. 60%, die aber trotzdem als zufriedenstellend betrachtet werden muß, da die Testinfektion auf i.c. Wege durchgeführt wurde (76). Andere Applikationen der Testinfektion waren bei erwachsenen Tieren unzurei-

chend, weil sie bei nicht vaccinierten Tieren nicht immer zum Tode führten. In dieser Versuchsreihe wurden ebenfalls mit EEI - inaktivierte Vaccinen mit und ohne Adjuvantien getestet. Als wirksamste Vaccinen stellten sich die oben erwähnten Vaccinen IV und V heraus, denen als Adjuvans Diäthylaminoäthyl-Dextran (DEAE-D) zugegeben wurde (76). Ferkel im Alter von 6 - 8 Wochen wurden mit der inzwischen modifizierten Vaccine (der Inaktivierungsvorgang wird mit EI durchgeführt) in einer Dosis von 5 ml i.m. geimpft. Bereits nach 1 Woche waren neutralisierende Antikörper zu 92% nachweisbar, deren Titer zwischen negativ und 1 : 130 schwankten. Diese Unterschiede wurden aber im weiteren Verlauf geringer, die Titer lagen dann zwischen 1 : 24 und 1 : 44. 1, 2, 3 bzw. 6 Wochen post vacc. wurden i.n. Belastungsinfektionen mit 10^8 - 10^9 KID₅₀ vorgenommen. In den ersten beiden Wochen reagierten die Impflinge mit leichtem Fieber, ungeimpfte Kontrolltiere starben bis auf ein Tier, das aber respiratorische Symptome zeigte. 3 Wochen post vacc. zeigte von 10 geimpften Tieren eine Lähmung der Hinterhand, während nur 2 von 3 Kontrollen Affektionen des Respirationstraktes hatten, allerdings hatten sie bedeutend höhere Körpertemperaturen als die Impflinge. Ferkel, die 6 Wochen post vacc. testinfiziert wurden erkrankten nicht, während 2 Kontrolltiere Lähmungen aufwiesen (86).

Weitere Wirksamkeitsprüfungen inaktivierter Pseudoutimpfstoffe wurden vornehmlich an Jungtieren durchgeführt.

Kristallviolett-, Betapropriolakton- und Saponinvaccinen wurden 2 Monate alten Tieren im Abstand von 10 Tagen zu je 2 ml s.c. verimpft. 30 Tage nach der ersten Impfung erfolgte eine Challenge-Infektion, die jeweils zur Hälfte mit 5×10^2 LD₁₀₀ i.c. und mit 2×10^4 LD₁₀₀ i.n. durchgeführt wurde. Der i.n. Challenge war ungeeignet, da auch die Kontrolltiere nicht erkrankten. Jeweils eines von je 3 i.c. testinfizierten Tieren starb, ein weiteres mit Betapropriolaktonvaccine geimpftes Schwein zeigte Anzeichen der Pseudowut, starb aber nicht. Der Antikörpertiter war bei diesen drei Vaccinen in etwa gleich, er lag nach der ersten Impfung zwischen 0 und 1,5 und nach der Wiederholungsimpfung zwischen 0 und 1,37 (53).

Die Kristallviolett vaccine wurde auch für Saugferkel (10 Tage alt) nach einer zweimaligen Impfung mit je 0,5 ml und im Zeitraum von 10 bis 15 Tagen einem i.c. Challenge mit 250 LD₅₀/Kaninchen gegenüber als wirksam bezeichnet. Neutralisierende Antikörpertiter waren von 1 : 2 bis 1 : 32 zu verzeichnen. Diese Vaccine bewies ihre Wirksamkeit auch in Kombination mit einer Schweinepest vaccine (54,55).

Ferkel im Alter von 8 - 37 Tagen wurden mit 2 - 3 ml und nach 10 Tagen als Wiederholungsimpfung mit 5 ml einer Saponinvaccine s.c. vacciniert. Sie überstanden zu 72% nach einmaliger Impfung und zu 89% nach der Revaccination einen i.n. mit 2 ml 10^5 - 10^6 KID₅₀ durchgeführten Challenge. Er wur-

de 18 - 54 Tage nach der ersten Impfung und 21 Tage nach der zweiten Impfung ausgeführt. Der NI lag durchschnittlich bei 0,6 bzw. bei Revaccination bei 3,7 (17).

Die Wirksamkeitsprüfung einer Formalin-inaktivierten Vaccine mit Saponin als Zusatz wurde folgendermaßen durchgeführt:

25 kg schwere Schweine (Versuch I) wurden in 4 Gruppen unterteilt, die mit je 10 ml, 5 ml, 2,5 ml und 1,25 ml s.c. geimpft und alle nach 21 Tagen mit 50000 DL_{50} Ajeszky-Kulturvirus i.n. belastet wurden. Der NI lag 21 Tage nach der Impfung bei der Impfdosis 10 ml zwischen 0,83 und 1,5, bei 5 ml zwischen 1,5 und 2,37, bei 2,5 ml zwischen 2,5 und 5,62 und bei 1,25 ml zwischen 2,24 und 4,16. 3 Wochen nach der Belastungsinfektion wurde eine weitere serologische Überprüfung der Seren der Tiere vorgenommen. Hierbei waren die Seren - bis auf eine Ausnahme - (1,25 ml Impfdosis) negativ. An die Testinfektion anschließend wurden zur Überprüfung der Virusausscheidung Nasentupferproben vorgenommen, deren Ergebnis bei den Impflingen nur bei einem mit 2,5 ml geimpften Tier 2 - 10 Tage post chall. positiv war. Bei ungeimpften Kontrolltieren war das Virus 5 - 6 Tage in der Nasentupferprobe und 8 Tage nach der Challenge-Infektion auch im Serum nachweisbar. In einer 2. Versuchsgruppe wurden Schweine mit 15 kg Körpergewicht mit 5 ml s.c. geimpft und nach 21 Tagen mit 100000 DL_{50} /ml i.n. testinfiziert. Ihre Neutralisationsindi-

ces betrugen 21 Tage post vacc. zwischen 2,16 - 4,5 und 3 Wochen nach der Belastungsinfektion O - O,16. Bei diesem Versuch schied kein Impfling Virus aus (25).

Eine weitere Wirksamkeitsprüfung einer Formaldehyd-inaktivierten Vaccine ergab mit einer einzigen Impfdosis von 5 ml bei Ferkeln einen Schutz vor einer experimentellen Infektion. Die Immunität entwickelte sich 8 Tage nach der Impfung (1).

Bei einer Wirksamkeitsprüfung einer Äthanol-inaktivierten Vaccine mit flüssigem Paraffin als Zusatz wurden Schweine, deren Lebensalter zwischen 1,5 und 10 Monaten betrug, mit 5 ml bzw. 10 ml i.m. geimpft und z.T. 15 bis 30 Tage post vacc. mit der gleichen Dosis revacciniert. 20 Tage nach der Impfung betrugen die NI (über die Berechnung des NI liegen keine konkreten Angaben vor) für einmal geimpfte Tiere zwischen 0 und 125, nach 10 ml Impfdosis und nach Revaccination zwischen 31 und 31620. Tiere, die mit 5 ml geimpft wurden wiesen nach einmaliger Impfung keine und nach Revaccination geringe Antikörpertiter (NI 15) auf. Im Ergebnis dieses Versuchs ist deutlich zu erkennen, daß auch das Lebensalter der Tiere in der Beurteilung eines Impfstoffes wichtig ist, denn die Bildung neutralisierender Antikörper nimmt bei älteren Tieren zu. Ferkel geimpfter Muttersauen wiesen 5 Tage post part. neutralisierende Antikörper der gleichen Höhe wie die Muttertiere auf (28).

Simeonov et al. (67) untersuchten ebenfalls eine Äthanol-inaktivierte Vaccine sowohl mit Saponin- als auch Paraffin-Zusatz. Sie impften Ferkel mit 3 ml, 5 ml bzw. 10 ml, revaccinierten nach 2 Wochen und belasteten sie anschließend mit 5000 LD₅₀/Schaf. Die Vaccine mit Saponin-Zusatz war wirksamer als die Vaccine mit Paraffin-Zusatz.

Vergleichende Wirksamkeitsuntersuchungen zwischen einer Glutaraldehyd- (bzw. Formaldehyd) inaktivierten Vaccine mit öligen Adjuvantien und einer Saponin-Vaccine mit Al (OH)₃ wurden an 4 - 6 Wochen alten Ferkeln durchgeführt. Die Impfung erfolgte mit 2 ml i.m. und z.T. 4 Wochen später die Revaccination. 2 - 4 Wochen nach der Impfung wurden die Tiere mit 10^{7,6} DCP₅₀ i.n. belastet. Nichtgeimpfte Kontrolltiere starben, Ferkel die mit der Vaccine mit öligen Zusätzen geimpft waren, hatten nach der Testinfektion im Gegensatz zu den mit der Saponin-Al (OH)₃ Vaccine nur einen leichten Temperaturanstieg über 3 Tage zwischen 39° - 40° C (20).

Neutralisierende Antikörper konnten bei Ferkeln nach einmaliger Impfung von 2 ml mit der Ölvaccine 15 Tage post vacc. mit einem NI von 1,8, 30 Tage post vacc. von 2,3 und 45 Tage post vacc. von 2,2 nachgewiesen werden. Nach zweimaliger Impfung mit beiden Vaccinen, nach einmonatiger Lagerung der Vaccinen, lagen die Antikörper bei den mit Ölvaccine geimpften Tieren zwischen 1 : 32 bis 1 : 256, bei der Al (OH)₃ Vaccine zwischen 0 und 1 : 9. Dieser Versuch wurde mit 11 Monate gela-

gerten Vaccinen wiederholt. Die Höhe der neutralisierenden Antikörper war zwischen 1 : 32 und 1 : 128 für die Ölvaccine und zwischen 1 : 1 und 1 : 4 für die Adsorbat-Vaccine.

Die Glutaraldehyd-inaktivierte Vaccine bestätigte auch in anderen Versuchen ihre Wirksamkeit. Sie schützte Mastschweine nach zweimaliger Impfung von je 1 ml, im Abstand von 3 - 4 Wochen i.m. appliziert, vor einer i.n. durchgeführten Testinfektion mit $2 \times 10^{5,8}$ KID₅₀/ml 14 Tage nach der letzten Impfung.

Ungeimpfte Kontrolltiere überlebten die Infektion mit virulentem Virus, das bei einem Ausbruch isoliert wurde, nicht. Tragende und nichttragende Schweine wurden nach dem gleichen Schema geimpft und wiesen nach beiden Impfungen neutralisierende Antikörper auf (Mastschweine bis 1 : 256). 10% von 108 geimpften Tieren bildeten keine Antikörper. 8% von 73 geimpften Sauen zeigten nach der Revaccination eine leichte anoretische Reaktion, die wahrscheinlich allergischen Ursprungs war. Dieser Impfstoff schützte auch Saugferkel geimpfter Mütter vor einer Belastungsinfektion in der vorher erwähnten Dosis. Sie bildeten neutralisierende Antikörper ab einem Alter von 3 Tagen (4).

2.4.3. Wirksamkeitsprüfung von Pseudowutimpfstoffen am Kaninchen

2.4.3.1. Lebendimpfstoffe

Kaninchen sind für das Pseudowutvirus sehr empfänglich (33). Aus diesem Grund sind Lebendimpfstoffe nicht für Kaninchen geeignet. Die Impfvirusstämme "K" und "BUK" töten Kaninchen ungeachtet ihrer Zellkulturpassagen. Lediglich das klinische Bild der Krankheit ändert sich mit steigender Passagenzahl des Impfvirus auf Grund des nachlassenden Juckreizes (70, 88).

2.4.3.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern

Die photoinaktivierte Vaccine wurde in 2 Versuchsgruppen an Kaninchen getestet. Eine Gruppe wurde s.c. mit 3 ml Vaccine geimpft und die Hälfte davon nach 11 Tagen mit der gleichen Dosis revacciniert. Die zweite Gruppe wurde mit 10 ml geimpft und z.T. nach 21 Tagen revacciniert. Die anschließende Testinfektion wurde mit ca. 200 KID₅₀ s.c. 6-8 Tage nach der Revaccination durchgeführt. Diesen Versuch überlebten alle mit 10 ml revaccinierten Tiere. 2 von 3 Impflingen, die eine Impfdosis à 10 ml erhalten hatten und kein Tier der Gruppe, die mit 3 ml geimpft wurde, überlebten. Serologische Untersuchungen wurden nicht vorgenommen (14).

Mit 0,003 M Formalin inaktivierte Vaccinen und Al (OH)₃ als Adsorbens wurden 6 Kaninchen innerhalb von 9 Tagen dreimal mit 1 ml s.c., 3 ml i.m. und als letzte Dosis mit 10 ml intraperitoneal geimpft. Im Anschluß an die letzte Impfung wurden die Kaninchen mit 1 ml virulentem Virus in den Verdünnungen 10³ - 10⁵ LD₅₀ i.m. belastet. Virusneutralisierende Antikörper waren nach der ersten Vaccination in einer Höhe von 1 : 8 bis 1 : 256 nachweisbar. Sie stiegen nach der Revaccination bis 1 : 512 an, bis auf 2 Ausnahmen, die zu diesem Zeitpunkt - obwohl sie nach der 1. Impfung Titer von 1:8 bzw. 1 : 16 hatten - keine nachweisbaren Antikörpertiter aufwiesen. Eines dieser beiden Tiere überlebte aber

ebenso wie die vier restlichen die Testinfektion mit 10^5 LD₅₀, während das andere - mit 10^3 LD₅₀ belastete - starb (89).

Glutaraldehyd (bzw. Formaldehyd)-inaktivierte Vaccine mit öligen Zusätzen wurde an Kaninchen zweimal in Dosen zu 2, 1, 0,5, 0,2 bzw. 0,1 ml innerhalb von 10 Tagen verimpft. Weitere 10 Tage später wurde eine s.c. Belastungsinfektion mit 2000 DCP₅₀/ml vorgenommen, die nur eines der mit der niedrigsten Impfdosis vaccinierten Tiere nicht überlebte. Dieses Schema wurde bis auf die Impfdosen, die in diesem Falle 3, 1,5, 0,75, 0,3, 0,15 ml betrugen - mit inaktivierter Vaccine, die Al (OH)₃ und Saponin enthielt - wiederholt.

Alle geimpften Tiere verendeten 4 - 9 Tage nach der Testinfektion.

Die Haltbarkeit der Glutaraldehydvaccine wurde ebenfalls im Tierversuch an Kaninchen getestet. Ab einer Lagerungszeit von 6 Monaten bei + 4° C tritt mit einer geringen Impfdosis (0,23 ml), die zweimal im Abstand von 14 Tagen i.m. appliziert wird, gegenüber einer Belastungsinfektion mit 100 DL₅₀ ein leichter Wirkungsverlust ein.

Von 5 geimpften Tieren starben 3.

Bei einer Lagerung der Vaccine über 11 Monate verspricht nur mehr eine Impfdosis von 2 ml eine volle Immunität (20).

Ebenfalls am Kaninchen wurde die Wirksamkeit einer mittels HNO_2 inaktivierten Vaccine untersucht. Sie wurden in verschiedenen Abständen 3 - 4 mal mit 1 - 2 ml des inaktivierten Virus i.v. geimpft. Neutralisierende Antikörper entwickelten sich relativ langsam und erreichten eine maximale Höhe von 1 : 32 bis 1 : 128 einige Wochen nach der letzten Impfung. Sie persistierten bei 2 von 6 Kaninchen länger als 3 Monate. Einem i.m. durchgeführten Challenge mit 300 KID_{50} eines homologen virulenten Virus widerstanden die Tiere, solange die Antikörper vorhanden waren. Ungeimpfte Kontrollen starben auch nach einer niedrigeren Dosierung des Challenge-Virus. Nach einer s.c. Impfung bildete nur eines von 5 Kaninchen niedrige Antikörper nach einer 3. und 4. Impfung (32).

2.4.4. Wirksamkeitsprüfung von Pseudowutimpfstoffen an Schafen und Rindern

2.4.4.1. Lebendimpfstoffe

Lebendvaccinen, deren Grundlage das Impfvirus "K" ist, wurden nur an Schafen auf ihre Wirksamkeit hin überprüft. 1 ml Vaccine (Virustiter $10^5 - 10^6$ KID₅₀/ml) wurde 19 Schafen einmal i.m. verabreicht. Eine zweite Gruppe - 8 Tiere - wurde nach 21 Tagen mit derselben Dosis revacciniert. 4 Wochen nach der ersten Impfung wurden sie mit 1 ml virulentem Virus i.m. belastet. Sämtliche unbehandelten Kontrolltiere starben ebenso, wie 3 nur einmal geimpfte. Tiere, die revacciniert wurden, zeigten keinerlei Symptome der Aujeszky'schen Krankheit. Serologische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt (6).

Die Notwendigkeit der Revaccination wurde auch von Boqnár und Kuscera (13) bestätigt. Sie erzielten mit einer einmaligen i.m. Impfung von 1 ml pro Vaccine (deren Titer zwischen $10^2 - 10^8$ LD₅₀/1,5 ml lag) einen 41%igen Schutz vor einer s.c. durchgeführten Challenge-Infektion mit 1 ml virulenten Virussuspensionen, mit Titern zwischen $10^{4,5} - 10^{5,5}$ LD₅₀/0,2 ml. 1, 2 und 3 Monate nach der Impfung. Eine immunisierende Wirkung hatten Vaccinen mit einem Virustiter von 10^4 und höher. Nach einer Revaccination 14 - 155 Tage nach der ersten Impfung mit der gleichen Dosis waren alle geimpften Schafe, gegenüber einer Testinfektion 14 Tage nach der letzten Impfung nach obigem

Schema, immun. Daraufhin wurde die Dauer der Immunität überprüft. Die Tiere wurden zweimal mit jeweils 1 ml Vaccine i.m. im Abstand von 3 Wochen vacciniert. Die s.c. Belastungsinfektion 3 Monate nach der letzten Impfung mit 1 ml virulentem Virus (Titer $10^{4,8}$ LD₅₀/0,2 ml) konzentriert, 1 : 10 und 1 : 100 verdünnt, überlebten alle Impflinge bis auf 2, die mit konzentriertem Virus belastet wurden.

5 Monate nach der Revaccination wurden Schafe nach dem gleichen Schema mit virulentem Virus (Titer $10^{6,3}$ LD₅₀/0,2 ml) belastet. Dabei starben alle mit konzentriertem und eines mit 1 : 100 verdünntem Virus infizierten Schafe. In einem weiteren Versuch wurde ein Vergleich der Wirksamkeit zwischen konzentrierter Vaccine und einer 1 : 100 verdünnten Vaccine angestellt. Der Impfmodus war ebenfalls eine zweimalige i.m. Impfung mit 1 ml im Abstand von 3 Wochen. 2 Monate nach der letzten Impfung wurden beide Impfgruppen einer s.c. Belastungsinfektion mit je 1 ml (Titer des Challenge-Virus 10^6 LD₅₀/0,2 ml) konzentriertem, 1 : 10 und 1 : 100 verdünntem Virus unterzogen. Keines der Schafe, die mit verdünnter Vaccine vacciniert wurden, überlebte - im Gegensatz zur anderen Gruppe - die Challenge-Infektion. 4 Monate nach der letzten Impfung wurde nach dem gleichen Schema verfahren, nur betrug in diesem Fall der Challenge-Virustiter $10^{5,6}$ LD₅₀/0,2 ml. Mit konzentrierter Vaccine geimpfte Schafe überlebten die Applikation des 1 : 10 verdünnten Testvirus zur Hälfte und die des 1 : 100 verdünnten

vollständig. Die verdünnte Vaccine erwies sich bei der Belastung mit 1 : 10 verdünntem Testvirus zu 50% als wirksam. 6 Monate nach der letzten Impfung wurde die Testinfektion mit einem Virus vorgenommen, dessen Titer $10^{5,3}$ LD₅₀/0,2 ml war.

Gruppe 1 (mit konzentrierter Vaccine) überlebte die Belastung des 1 : 100 verdünnten Virus vollständig, Gruppe 2 zur Hälfte. Zuletzt wurde die Wirksamkeit der Vaccine 8 Monate nach der Revaccination überprüft. Der Titer des Challenge-Virus (das in diesem Falle auch noch 1 : 1000 verdünnt war) betrug $10^{5,9}$ LD₅₀/0,2 ml.

Gruppe 1 überlebte die Belastungsinfektion mit den drei Verdünnungsstufen des Challenge-Virus jeweils zur Hälfte. Gruppe 2 erwies sich ebenfalls zu 50% gegenüber der Infektion mit dem 1 : 100 und 1 : 1000 verdünnten Virus als immun. Die Überprüfung des Blutserums auf neutralisierende Antikörper zeigte, daß nach einer Impfung die Titer zwischen 0 und 1 : 8 und nach der Revaccination zwischen 0 und 1 : 128 lagen. Die Ergebnisse dieser Versuche beweisen, daß der Impfschutz nach zweimaliger Applikation über kürzere Zeit vollständig ist und sich teilweise auch über einen längeren Zeitraum erstreckt. In diesem Fall muß aber der Vaccinetiter relativ hoch und die Belastungsinfektion darf nicht sehr massiv sein.

In weiteren Versuchen wurden Schafe einmal mit 1 ml i.m. (entspricht $10^{4,2}$ KID₅₀/ml) dieses Impfstoffes geimpft und zum Teil nach 3 Wochen mit der gleichen

Dosis revacciniert. 3 bzw. 19 Wochen post vacc. wurden sie einer Belastungsinfektion mit 0,2 ml (entspricht einer Virusdosis von 2×10^2 KID₅₀/ml) intradermal (i.d.) eines virulenten Virus (Virusstamm van Doorn, Titer $10^{5,5}$ KID₅₀/ml) belastet. Diese Testinfektion überlebten alle einmal und zweimal geimpften Tiere, im Gegensatz zu ungeimpften Kontrollschafen. Neutralisierende Antikörper konnten nur bei den revaccinierten Tieren nachgewiesen werden. Ihre Titer lagen 2 Wochen nach der Revaccination zwischen 1 : 2 und 1 : 8. Fluoreszierende Antikörper waren bei beiden Impfgruppen in einer Höhe von 1 : 32 bis 1 : 128 vorhanden (60).

Das attenuierte Impfvirus "BUK" wurde nach 366 - 621 Passagen in FHE - Zellen nach s.c. und i.m. Inokulation von 10^4 - 10^8 KID₅₀/ml für 2 Monate alte Kälber als unschädlich bezeichnet. Alle geimpften Tiere waren vor einem i.m. durchgeführten Challenge mit 10^3 - 10^7 KID₅₀/ml des virulenten Virusstammes "CVVD" geschützt. Diese Belastungsinfektion überlebten ebenfalls 2 von 7 i.m. geimpften 15 Tage alten Kälber. Neutralisierende Antikörper wurden gebildet, über ihre Höhe liegen aber keine näheren Angaben vor (70).

Zur weiteren Verbesserung der Sicherheit und Wirksamkeit von Vaccinen des Virusstammes "BUK" für Schafe und Rinder wurde der Impfstamm durch weitere Zellkulturpassagen modifiziert. Er bewies seine Wirksamkeit bei der Impfung eines Mastrinderbestandes. Es wurden mit dieser Virusvariante - B/840/III/4a genannt - zuerst 40 Tiere geimpft. Nach einer Zeitspanne von 21 Tagen, in der sich Impferkrankungen hätten zeigen

müssen, wurden weitere 180 Tiere mit 2 ml Vaccine (entspricht 4×10^6 PFU) im Abstand von 3 Wochen zweimal s.c. geimpft. Die Impflinge wiesen 2 Wochen nach der ersten Impfung neutralisierende Antikörper von 0 - 1 : 4 auf, 2 Wochen nach der Revaccinierung lagen sie zwischen 0 und 1 : 128. Eine Testinfektion zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde nicht durchgeführt (96). Nach 387 CAM-Passagen und weiteren 250 an FHE-Zellen war das Impfvirus "BUK" auch für Schafe wirksam. 7 Tiere wurden mit je 1 ml der Vaccine (Titer $10^{5,5}$ KID₅₀/ml) und ihren Verdünnungen 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 40 i.m. geimpft. 6 Schafe widerstanden einer i.m. durchgeführten Challenge-Infektion mit virulentem Virus. Das 7. Schaf (Vaccine-Verdünnung 1 : 5) starb vermutlich interkurrent nach der Challenge-Infektion. Neutralisierende Antikörper traten nach einer Impfung in der Höhe von 1 : 2 - 1 : 16 und nach der zweiten Impfung mit derselben Dosis 21 Tage nach der ersten Impfung zwischen 1 : 32 und 1 : 64 auf. Aus diesem Grunde sind 2 Impfungen als wirksamer anzusehen (79). In weiteren Versuchen gelang es über eine Plaqueklonisierung speziell für Schafe eine unschädliche Virusvariante zu isolieren.

Dieser Impfvirusstamm "BUK - TK - 300/9,2 -" genannt wurde in 2 Versuchen auf seine Wirksamkeit an 8 - 10 Monate alten Schafen untersucht. Für den 1. Versuch wurden 4 Tiere mit 2 ml i.m. geimpft, nach 4 Wochen revacciniert und nach weiteren 4 Wochen mit virulentem Virus des Stammes "Rača - TK - 5" in einer Dosis von 10^5 LD₅₀ i.m. belastet. Die Impfdosen enthielten ver-

schiedene Viruskonzentrationen, von denen die Höhe der neutralisierenden Antikörper, die nach jeder Impfung bestimmt wurden, abhing. 2 Tiere, die mit 2×10^1 KID₅₀ bzw. mit 2×10^3 KID₅₀ vacciniert wurden, bildeten nach der 1. Impfung keine Antikörper. Bei der Impfdosis von 2×10^5 KID₅₀ lagen die Antikörpertiter nach der 1. Impfung bei 1 : 2 und bei 2×10^7 KID₅₀ bei 1 : 3. Die Revaccinierung, die ausnahmslos mit $2 \times 10^{7,5}$ KID₅₀ durchgeführt wurde, stimulierte bei den beiden Tieren, deren erste Inokulationsdosis niedrig war, eine Antikörperproduktion in einer Höhe von 1 : 3 bis 1 : 5,5. Bei den anderen beiden Schafen lagen die neutralisierenden Antikörper zwischen 1 : 6 und 1 : 8. Die serologische Untersuchung nach der Challenge-Infektion ergab für alle Tiere Serumtiter von 1 : 8. Daraufhin wurde ein 2. Versuch mit einer Revaccination 8 Wochen nach der 1. Impfung mit den gleichen Dosen und einer Challenge-Infektion 10 Monate nach der Wiederholungsimpfung unternommen. Die Impfgruppen bestanden aus je 4 Tieren. Bei der 1. Gruppe betrugen die Inokulationsdosen $2 \times 10^{1,5}$ KID₅₀. Neutralisierende Antikörper waren nach der Revaccination in einer Höhe von 1 : 3 zu verzeichnen. Sie sanken bis zur Challenge-Infektion bis 1 : 2 ab und stiegen nach der Belastungsinfektion - die 2 Tiere nicht überlebten - auf 1 : 8 an.

Die 2. Gruppe wurde zweimal mit $2 \times 10^{3,5}$ KID₅₀ geimpft. Vor der Revaccination waren die Serumtiter < 1 : 2, stiegen auf 1 : 4 nach der 2. Impfung an

und sanken 4 Wochen später auf 1 : 3. Die Challenge-Infektion überlebten 3 Tiere, ihre Titer stiegen daraufhin auf 1 : 8. Die beiden anderen Impfgruppen, mit $2 \times 10^{5,5}$ KID₅₀ und $2 \times 10^{7,5}$ KID₅₀ vacciniert, überlebten die Testinfektion symptomlos. Nach der 1. Impfung lagen die Antikörpertiter bei 1 : 2, stiegen nach der Revaccination bei der mit $2 \times 10^{7,5}$ KID geimpften Gruppe auf 1 : 8 und fielen bis zur Infektion langsam auf 1 : 5 ab. Die mit $2 \times 10^{5,5}$ KID₅₀ geimpften Tiere hatten nach der Revaccination Titer bis 1 : 6, die bis zum Challenge ebenfalls auf 1 : 5 fielen. Beide Gruppen wiesen nach der Infektion Titer von 1 : 8 auf (94).

Mit diesen Versuchen wurde für Schafe die Wirksamkeit dieses Impfvirusstammes bei Inokulationsdosen ab 10^5 KID₅₀ über 10 Monate bewiesen (94).

2.4.4.2. Vaccinen aus inaktivierten Erregern

Besonders effektiv erwiesen sich hierbei Vaccinen, die mit Äthanol inaktiviert und mit Paraffin oder Saponin als Adjuvantien versetzt waren.

Schafe wurden mit 15 ml s.c. einer Äthanol-Vaccine geimpft, die 2 - 150 Tage bei $+4^{\circ}\text{C}$ und $+20^{\circ}\text{C}$ gelagert war. 20 Tage nach der Impfung wurden sie mit 15 ml s.c. eines virulenten Pseudowutvirus belastet. Diese Menge entspricht ca. $10^5 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$. Sämtliche geimpften Tiere überstanden im Gegensatz zu ungeimpften Kontrolltieren die Challenge-Infektion symptomlos. Die Neutralisationsindices lagen 20 Tage nach der Impfung zwischen 3161 und 5623. Damit wurde auch die 100%ige Wirksamkeit der Vaccine nach einer längeren Lagerzeit bei $+20^{\circ}\text{C}$ nachgewiesen. In einem weiteren Versuch wurde als minimale Impfdosis, die eine Schutzquote von 50% darstellt, 5 ml festgestellt.

Kälber erhielten 20 ml s.c. dieser Vaccine und wurden ebenfalls 20 Tage nach der Impfung einer s.c. Challenge-Infektion mit $5 \times 10^5 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$ unterzogen, die alle geimpften Kälber symptomlos überlebten. Der Neutralisationsindex der neutralisierenden Antikörper lag bei 24 bis 96. Ältere Rinder wurden mit dieser Dosis zweimal im Abstand von 20 Tagen geimpft und ebenfalls serologisch untersucht. Hier betrug der Neutralisationsindex nach der ersten Impfung zwischen 216 und 8261 - 20 Tage nach der zweiten

Impfung zwischen 31620 und 82610 - und 35 Tagen nach der zweiten Impfung zwischen 82 620 und 826 100. Einer Belastungsinfektion wurden sie nicht unterzogen (28).

In weiteren Untersuchungen wurden Äthanol-Vaccinen mit Paraffin- und mit 0,2 % Saponin-Zusätzen miteinander bezüglich ihrer Wirksamkeit verglichen. Dabei wies die Vaccine mit Saponinzusatz eine bessere Wirksamkeit auf. Eine Inokulation von 1, 3 bzw. 5 ml Vaccine schützte Schafe vor einer i.c. Challenge-Infektion mit 5000 LD₅₀/Schaf. 3 Wochen nach der Impfung waren neutralisierende Antikörper in einer Höhe von 1 : 8 bis 1 : 16 zu verzeichnen (67).

Auch Äthanol-inaktivierte Vaccinen mit Al (OH)₃ als Zusatz bewiesen ihre Wirksamkeit. Die Schafe wurden mit 5 ml Vaccine (Titer vor der Inaktivierung $5 \times 10^{7,5} - 10^{8,5}$ KID₅₀/ml) s.c. geimpft. Nach 3 Monaten wurden sie revacciniert und 165 Tage nach der ersten Impfung s.c. mit virulentem Virus belastet. Die Tiere widerstanden der Challenge-Infektion. Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen wurden nicht angegeben (58).

Auch eine Vaccine, die mit 0,05% Formaldehyd inaktiviert und an Al (OH)₃ absorbiert war, ist für Schafe auf ihre Wirksamkeit getestet worden. Sie wurden mit einer Impfdosis zwischen 1 und 5 ml Vaccine geimpft und waren 8 Tage nach der Impfung vor einer experimentellen Infektion geschützt (1).

Vergleichende Wirksamkeitsuntersuchungen von Kristallviolett-, Betapropiolakton- und Saponin-inaktivierten Adsorbatvaccinen sind ebenfalls am Schaf vorgenommen worden. Zwei Chargen Kristallviolettadsorbatvaccine, eine mit 0,1%iger, die andere mit 0,2%iger Kristallviolettlösung inaktiviert, wurden an Schafe verimpft. Die Impfdosis betrug 5 ml bzw. für einen Teil der Tiere zweimal 5 ml im Abstand von 10 Tagen und wurde s.c. durchgeführt. 25 Tage nach der ersten Impfung wurden sie mit 5×10^3 DL₁₀₀ virulentem Virus testinfiziert. Von den je zwei einmal mit beiden Impfstoffchargen geimpften Tiere starben je eines und sämtliche Kontrollschafe an Symptomen der Aujeszky'schen Krankheit. Die anderen beiden einmal vaccinieren und alle revaccinierten Tiere verfügten über eine gute Immunität. Serologische Untersuchungen wurden in diesem Fall nicht vorgenommen. Der gleiche Impfmodus wurde mit 4 Betapropiolaktonadsorbatvaccinen, die mit 0,03, 0,05, 0,1 bzw. 0,2% Betapropiolakton inaktiviert waren, vorgenommen. In diesem Fall erwiesen sich alle ein- und zweimal geimpften Tiere gegenüber der Challenge-Infektion, die mit der gleichen Dosis durchgeführt wurde, als immun. Neutralisierende Antikörper wurden nach einer Impfung zwischen 0 und 1,45 und nach der zweiten Impfung zwischen 0 und 1,75 festgestellt. Die Wirksamkeitsprüfung einer mit 0,3% Saponin inaktivierten Vaccine wurde ebenfalls nach dem gleichen Schema durchgeführt. Auch hier überlebten alle vaccinieren Tiere die Testinfektion.

Neutralisierende Antikörper waren nach einer Impfung zwischen 0 und $\geq 1,5$ und nach der zweiten Impfung zwischen 0,94 und $\geq 1,75$ zu verzeichnen. Im Gegensatz zu Betapropiolakton-Vaccinen haben alle mit der Saponinvaccine geimpften Tiere nach der Revaccination neutralisierende Antikörper gebildet. Die Ergebnisse der Testinfektion ergeben für diese beiden Vaccinen auch nach einmaliger Impfung einen 100%igen Schutz. Die Saponinadsorbatvaccine schützt Schafe ca. 6 Monate (53).

Für die Wirksamkeitsprüfung einer Pseudowutvaccine, die mit EI inaktiviert und mit DEAE - Dextran als Adjuvans versetzt war, wurden Kälber herangezogen. Die Impfdosis betrug 10 ml i.m., Revaccinationen erfolgten mit den gleichen Inokulationsdosen 28 Tage bzw. 5 Monate nach der ersten Impfung. 9 Monate nach der ersten Vaccination wurden sie mit 10^6 PFU des virulenten Virusstammes "Holland" i.m. testinfiziert. Zwei der vier vaccinierten Kälber hatten am Tage nach dem Challenge einen Körpertemperaturanstieg, der aber nach einem halben Tag wieder fiel. Das ungeimpfte Kontrolltier starb 2 Tage nach der Belastungsinfektion unter den Symptomen der Pseudowut. Nach der ersten Impfung waren die Titer der neutralisierenden Antikörper auf 1 : 2, 1 : 4 und 1 : 14 angestiegen. Die Revaccination brachte einen Anstieg um das 4- bis 16-fache (zwischen 1 : 16 und 1 : 256), die dritte Impfung stimulierte die neutralisierenden Antikörper bis auf Werte von 1 : 1024. 9 Wochen nach der dritten

Impfung fielen sie wieder ab, lagen aber immer noch höher als nach der zweiten Impfung. Bei komplementbindenden Antikörpern stiegen die Werte nach der ersten Impfung (1 : 4 - 1 : 36) höher als die neutralisierenden, fielen aber auch wieder schneller und zeigten bei den folgenden Impfungen (1 : 16 - 1 : 64) nur einen kurzdauernden Boostereffekt. Im Gegensatz zur ersten Impfung waren die Titer der komplementbindenden Antikörper nach der 2. und 3. Impfung wesentlich niedriger als die der neutralisierenden (34). Diese Vaccine, allerdings mit EEI inaktiviert, war auch für Schafe nach zweimaliger Inokulation wirksam. Die Impfdosis betrug 7 ml i.m., die Revaccination erfolgte nach 4 Wochen. Die Tiere wurden mit $10^3 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$ zu 0,2 ml intradermal (i.d.) mit dem virulenten Virusstamm "Van Doorn" in Gruppen zu je 4 Tieren 1, 4 und 7 Monate nach der 2. Impfung belastet. Die geimpften Tiere überlebten ohne klinische Symptome der Pseudowut den Challenge, während die Kontrolltiere typische Anzeichen der Aujeszky'schen Krankheit zeigten. Die neutralisierenden Antikörper der Schafe lagen 1 Monat nach der 1. Impfung zwischen 1 : 4 und 1 : 32 und 1 Monat nach der 2. Impfung zwischen 1 : 32 und 1 : 64. Die Höhe der fluoreszierenden Antikörper war nach der 1. Impfung 1 : 128 und 1 : 1024 und nach der 2. Impfung generell höher als 1 : 512 (60).

2.4.5. Wirksamkeitsprüfung von Pseudowutimpfstoffen am Fleischfresser

2.4.5.1. Lebendimpfstoffe

Über die Eignung des Impfvirusstammes "BUK" zur Immunisierung von Hunden und Katzen berichteten bereits Suhaci et al. (79) bei ihren Immunisierungsversuchen an Schweinen und Schafen. Weiterhin wurde anhand einer Kombinationsimpfung gegen die Pseudowut und den Botulismus die Immunisierung von Nerzen untersucht. Dabei fand der Virusstamm "BUK - TK 300/9,2" und Botulinusanatoxin, in unverdünnter Konzentration an $Al(OH)_3$ adsorbiert, Verwendung. Die Dosis der Impfung gegen die Aujeszky'sche Krankheit betrug 1 ml, d.h. ca. $10^{6,5}$ KID₅₀/ml. Die Impfungen wurden sowohl simultan an verschiedenen Körperstellen, als auch kombiniert in einer Injektion verabreicht. Dabei erwies sich eine kombinierte Impfung, bei der die lyophilisierte Aujeszkyvaccine in der Botulinusvaccine gelöst wird, als wirksam. Der Impfstoff soll zweimal innerhalb von 4 Wochen appliziert werden.

Die Wirksamkeit dieser Vaccine bezüglich der Pseudowut wurde anhand der auftretenden neutralisierenden Antikörper festgestellt. Der durchschnittliche Antikörpertiter der Nerze betrug nach alleiniger Impfung mit Aujeszkyvaccine 27,3, nach simultaner Impfung gegen Botulismus 16,6 und nach der Kombinationsimpfung 43,1. Möglicherweise beruht der höhere Antikörpertiter nach der Kombinationsimpfung auf dem in der Botulinusvaccine enthaltenen $Al(OH)_3$ (95).

2.4.5.2. Impfstoffe aus inaktivierten Erregern

An Hunden wurden vergleichende Wirksamkeitsuntersuchungen mit einer Formalin-inaktivierten Al (OH)₃-Adsorbatvaccine mit Saponin als Zusatz und mit einer Betapropiolakton-inaktivierten Vaccine mit öligen Zusätzen vorgenommen. Die Betapropiolaktonvaccine wurde 3 Versuchsgruppen mit je 5 Hunden i.m. appliziert, der ersten Gruppe 2 x 2 ml im Abstand von 8 Tagen, der zweiten Gruppe einmal 2 ml und der dritten Gruppe einmal 1 ml. Die Al (OH)₃-Adsorbatvaccine wurde nach dem gleichen Schema verimpft mit zweimal 4 ml, einmal 4 ml und einmal 2 ml. 21 Tage nach der letzten Impfung wurden serologische Untersuchungen und eine i.m. applizierte Challenge-Infektion mit 1000 DCP₅₀/ml Aujeszky-Virus durchgeführt. Von den mit der Betapropiolaktonvaccine geimpften Tieren erwies sich von den revaccinierten Hunden einer als nicht geschützt, er zeigte bei der serologischen Untersuchung einen NI von 2,0, während dieser bei den vor der Testinfektion geschützten Tieren bei 2,5 - 2,75 lag. Das Zahlenverhältnis geschützt/nicht geschützt, war bei einmal mit 2 ml geimpften Hunden gleich, der NI lag bei den geschützten Tieren zwischen 2,0 - 2,5. Bei dem Hund, der der Testinfektion nicht widerstand, betrug er 1,0. In der dritten Gruppe erlagen 3 Tiere der Testinfektion mit einem NI von 1,0 - 1,25, während die zwei Überlebenden einen NI von 1,75 aufwiesen. Die Ergebnisse des Impfversuchs mit der Al (OH)₃ - Vaccine waren folgendermaßen:

In der ersten Gruppe haben 3 Hunde mit einem NI von 2,25 - 2,75 überlebt, die anderen hatten einen NI von 1,0 bis 1,5. Von den mit einmal 4 ml geimpften Tieren erwiesen sich 2 als immun mit einem NI von 1,75 - 2,0. Die drei Tiere, die der Testinfektion erlagen, zeigten einen NI von 1,0 - 1,5. Von der letzten Versuchsgruppe überlebte kein Hund die Belastungsinfektion - die Neutralisationsindices lagen bei 0,75 - 1,5. Insgesamt erwies sich die Betapropiolaktonvaccine mit öligen Adjuvantien für Hunde wirksamer als die $Al(OH)_3$ - Adsorbatvaccine; allerdings stellte sich bei diesen Versuchen heraus, daß die neutralisierenden Antikörper bei Hunden relativ niedrig liegen und daß ihre Konzentration in keinem Zusammenhang mit der Resistenz gegen eine Challenge-Infektion steht (26).

2.5. Prüfung der Unschädlichkeit der Impfstoffe

2.5.1. Allgemeines

- a) Ein Impfstoff darf nach der Inokulation generell keine pathologischen Erscheinungen irgendwelcher Art hervorrufen.
- b) Ein Impfstoff darf nach einer Verimpfung keinerlei Symptome der betreffenden Krankheit im Impfling auslösen.

Um die Unschädlichkeit eines Impfstoffes festzustellen, sind verschiedene Untersuchungen erforderlich.

- a) Bei inaktivierten Vaccinen ist eine Kontrolle des Inaktivierungsvorgangs wichtig. Sie geschieht mit physikalisch-chemischen Methoden, im Tierversuch und mit der Beimpfung von Zellkulturen.
- b) Zur Kontrolle einer eventuellen Kontamination des Impfstoffes mit Bakterien, Pilzen oder Viren werden entsprechende Untersuchungen auf Nährböden oder -lösungen und in Zellkulturen durchgeführt.
- c) Toxizitätskontrollen finden ebenfalls im Tierversuch oder mit chemischen Methoden statt. Es werden auch die Zusätze eines Impfstoffes, wie Adjuvantien oder Adsorbentien auf eine mögliche Toxizität hin untersucht.
- d) Fernerhin muß speziell bei Schlachttieren auch eine Untersuchung des Fleisches vorgenommen wer-

den, um mögliche Veränderungen bezüglich der Qualität, die durch eine Impfung bedingt sein können, auszuschließen bzw. die Dauer von Wartezeiten festzulegen.

- e) Der Nachweis, daß der Impfstoff keine Symptome der Pseudowut hervorruft, wird gewöhnlich mit der Verimpfung der Vaccine auf Kaninchen durchgeführt. Denn diese Tierart ist für das Pseudowutvirus so empfänglich, daß jede mögliche Restvirulenz des Impfstoffes bei Kaninchen die Pseudowut hervorruft. Außerdem wird die Unschädlichkeit von Vaccinen auch an den Tierarten nachgewiesen, für die die Vaccine bestimmt ist.

2.5.2. Kontrolle des Inaktivierungsvorganges

Nach der Inaktivierung von Virus darf in der so erhaltenen Virussuspension kein vermehrungsfähiges Virus mehr vorhanden sein. Um dies zu überprüfen, werden einerseits Versuchstiere und andererseits Zellkulturen mit dem inaktivierten Virus geimpft. Als Versuchstiere werden in der Regel Kaninchen benutzt. Sie erhielten zwischen 1 ml und 10 ml inaktivierte Virussuspension i.m. oder intraperitoneal (i.p.) und wurden 14 bis 21 Tage beobachtet (9,14,34,76,89). Die Tiere dürfen keine Symptome der Pseudowut aufweisen. Weiße Mäuse wurden i.c. mit inaktivierter Virussuspension geimpft und blieben ebenfalls symptomlos (40). Inaktivierte Virussuspensionen dürfen nach Beimpfung auf Zellkulturen keine zytopathischen Effekte hervorrufen. Auf Baby-Hamster-Nierenzellen (BHK-21) wurde sowohl 1 : 4 verdünnte als auch konzentrierte Suspension verimpft (56,76). Schweinenierenzellen wurden mit 5 ml zuvor dialysierter Virussuspension beimpft und nach 5 Tagen auf nichtbeimpfte Schweinenierenzellen verimpft und weiter beobachtet (9). Auch an FHE-Zellkulturen wurde der Inaktivierungsvorgang beobachtet (32,89,99).

2.5.3. Kontrolle auf Kontamination mit Bakterien, Viren und Pilzen

Um eine Verunreinigung der Vaccinen mit Bakterien oder Pilzen auszuschließen, wird die Vaccine auf verschiedene Nährböden beimpft, bebrütet und anschließend beurteilt (9,13,25,26,53,54). Zur Impfung dürfen nur die Vaccinen verwendet werden, die steril geblieben sind. Die Sterilitätskontrollen der kommerziellen Glutaraldehydvaccine mit öligen Adjuvantien wurde einmal an flüssigen Nährmedien, an Fleischbouillon, Thioglykolatbouillon und Sabouraud - Nährböden vorgenommen. Die Proben werden unter sterilen Kautelen entnommen und mit ca. 0,5 ml auf die Nährmedien verimpft. Außerdem wird die Sterilität auch an festen Nährböden, wie schräg erstarrter Gelatine und Gelatine in Petrischalen nachgewiesen. Jede Kontrolle wird bei 37° C - 22° C und bei 4° C 8 Tage lang inkubiert. Alle Proben müssen steril bleiben (9).

Die Untersuchung auf eine mögliche Kontamination mit Viren wird in vitro und in vivo durchgeführt. Zellsuspensionen (Konzentration von 10^6 /ml) werden durch Gefrieren und Auftauen lysiert und dann auf eventuell vorhandene Viren hin geprüft. Weiterhin werden Zellenlysate auf erstmals entnommene Nierenzellen junger Schweine und Kälber inokuliert. Nach einer Stunde wird das Lysat entfernt und durch Nährlösung ersetzt. Sie werden 10 Tage lang beobachtet. Anschließend wird der Zellrasen durch Gefrieren und Auftauen zerstört und eine Subkultur angelegt.

Die Prüfung der Subkulturen muß negativ bleiben, d.h. es dürfen keine zytopathischen Effekte auftreten.

Junge Mäuse werden mit 0,02 ml i.c. und 0,1 i.p. injiziert und 10 Tage lang beobachtet. Im Todesfall werden die betreffenden Mäuse homogenisiert und einer weiteren Gruppe von Mäusen injiziert.

Außerdem werden Zellsuspensionen von 3 Mio. Zellen/ml 30 kg schweren Ferkeln s.c. in einer Menge von 1 ml inokuliert. Die Körpertemperatur wird täglich gemessen und mit der Temperatur von nichtbehandelten Kontrollferkeln verglichen. Nach 20 Tagen werden die Tiere getötet und pathologisch untersucht. Die Höhe der Körpertemperatur und das Ergebnis der pathologischen Untersuchung muß mit den Kontrollferkeln übereinstimmen (9).

2.5.4. Toxizitätskontrollen

Sämtliche Bestandteile der kommerziellen Glutaraldehydvaccine mit öligen Adjuvantien müssen auf eventuelle Toxizität hin untersucht werden.

Die Zellkultur, in der das Virus gezüchtet wird, wird auf eventuelles onkogenes Verhalten hin getestet. Zellsuspensionen zu je 0,1 ml mit einem Mindestgehalt von 90 % lebensfähiger Zellen werden in Konzentrationen von 10^1 , 10^2 , 10^3 und 10^6 je 6 Hamstern in die Jugaltaschen injiziert. Die Jugaltaschen werden über 60 Tage je zweimal pro Woche untersucht. Konzentrationen von oder unter 10^4 dürfen keine Tumoren erzeugen.

Die Bestandteile der Vaccine werden physikalisch-chemischen Untersuchungen auf Dichte, Viskosität, Verseifungszahl, Hydroxylzahl oder Jodzahl unterzogen. Vaselineöl muß von karbonisierbaren Stoffen und Sulfidabkömmlingen frei sein und die Säurezahl muß unter 0,05 liegen.

Toxizitätskontrollen des fertigen Impfstoffs werden an Mäusen mit 10 g oder Ratten von 100 g durchgeführt. Den Tieren wird 0,2 ml Vaccine injiziert und anschließend werden die Tiere täglich gewogen und eine Wachstumskurve erstellt. Diese Kurve muß mit der von unbehandelten Kontrolltieren vergleichbar sein, um eventuelle Wachstumsstörungen auf Grund der Vaccinierung auszuschließen.

Auch zwei Schweine werden mit einer bzw. 2 Impfstoffdosen behandelt und 15 Tage lange genau beobachtet.

Nach der Tötung der Tiere muß die Inokulationsstelle frei von lokalen Schädigungen sein. Zugleich wird eine Qualitätsprobe des Schweinefleisches erstellt, um die Abwesenheit von Beeinträchtigungen durch die Impfung festzustellen (9).

2.5.5. Unschädlichkeitsprüfung am Schwein

Zur Sicherstellung der Unschädlichkeit des Impfvirusstammes "BUK" wurden Schweine jedes Alters mit verschiedenen Zellkulturpassagen des Impfvirus, verschiedenen Inokulationsdosen und -arten geimpft. Das Virus in der 200. FHE-Passage ist für vierwöchige Ferkel zwar nach i.c. Applikation von $1,86 \times 10^5$ PFU tödlich, aber nach i.n., s.c., i.m., i.p. und peroraler Inokulation von $3,72 \times 10^6$ - $1,86 \times 10^7$ PFU unschädlich. Mutter-schweine in verschiedenen Graviditätsstadien wurden zweimal innerhalb von 3 Wochen mit ca. 8×10^6 PFU geimpft. Alle Tiere warfen zum errechneten Zeitpunkt normal entwickelte und lebensfähige Ferkel. Das Virus konnte weder in den Fruchthäuten noch in Organen von Ferkeln - von jedem Wurf wurden 2 Ferkel gleich nach der Geburt getötet - nachgewiesen werden (90). Auch nach einer Applikation des Virus der 335. FHE-Passage traten bei neugeborenen Ferkeln und tragenden Muttertieren keinerlei Störungen auf (17). Mit 1 : 5 verdünntem Virus (Titer: $10^{6,37}$ ID₅₀/Kan.) Der 258. CAM-Passage widerstehen 45 Tage alte Ferkel der i.c. Infektion. Bei der 387. CAM-Passage und weiteren 220 bzw. 250 FHE-Passagen mit Virustitern von $10^{5,4}$ bzw. $10^{5,2}$ KID₅₀ überleben je 2 von 4 i.c. mit 0,5 ml Virussuspension geimpfte Ferkel ohne Krankheitssymptome (79). Keinerlei Symptome der Pseudowut zeigten Schweine im Alter von 2 und 4 Monaten bzw. 2 - 3 Jahren nach der Verimpfung des Impfvirus "BUK" in

der 250. - 621.FHE-Passage. Die Inokulationsdosen betragen zwischen 10^5 KID bei i.c., $2 - 5 \times 10^7$ KID₅₀ bei i.m. und $10^5 - 10^9$ KID₅₀ bei s.c. Applikation (71). Bis zur 253. Passage ist die avianisierte Virusvaccine für Sauen in den ersten drei Graviditätsmonaten und für Ferkel ab 8 Tage unschädlich. Ab dieser Passagezahl ist sie auch für Muttertiere in den letzten Graviditätsmonaten und der ersten Laktationsphase avirulent. Allerdings zeigte ein Teil der gesäugten Ferkel Symptome der Pseudowut. Nach Verimpfung der 308. und folgender Zellkulturpassage erkrankten auch gesäugte Ferkel nicht mehr. Bis zur 343. Passage sollen Ferkel von 0 - 6 Tagen nicht geimpft werden, da noch ca. 30 % der Tiere unter Anzeichen der Pseudowut starben (16). Auch aus Schweinen, die vor oder nach der Impfung mit Cortisongaben immunosupprimiert wurden, konnte das Vaccinevirus nicht isoliert werden (81). In den meisten Fällen wurde die Unschädlichkeitsprüfung inaktivierter Vaccine durch Inokulation an Kaninchen vorgenommen. Lediglich eine Formaldehyd-inaktivierte $Al(OH)_3$ - Adsorbatvaccine mit Saponinzusatz wurde speziell an Schweinen vor Beginn der Wirksamkeitsprüfungen getestet. 3 Schweine wurden mit 5,10 bzw. 15 ml Vaccine s.c. geimpft. Sie vertrugen die Inokulation symptomlos (25). Für jede Impfstoffserie der Glutaraldehyd-inaktivierten Vaccine mit öligen Adjuvantien werden 2 Tiere mit ca. 7 - 8 Wochen, die frei von Pseudowutantikörpern sein müssen i.m. mit 2 ml bzw. 4 ml geimpft. Sie werden anschließend 15 Tage lang geobachtet (9).

2.5.6. Unschädlichkeitsprüfung am Kaninchen

Unschädlichkeitsuntersuchungen am Kaninchen mit Lebendvaccinen des "K"-Stammes mit Vaccinetitern von 10^1 - 10^8 zeigten, daß 50,5 % der Tiere gestorben, 16,7 % erkrankt und 32,8 % gesund geblieben sind. Bis zum Vaccinetiter 10^4 starben unter Lähmungerscheinungen, jedoch ohne Juckreiz $1/3$ - $1/4$ der Tiere, ab diesem Titer jeweils die Hälfte oder mehr. Sie wurden mit 0,2 ml i.m. geimpft(13). Die Inokulation des Impfvirusstammes "BUK" nach 400 FHE - Passagen hatte ebenfalls den Tod der Tiere zur Folge. Auch in diesem Fall hatten die Tiere ab 50 und mehr Kulturpassagen des Virus keinen Juckreiz mehr (90). Die Inokulation des modifizierten Impfvirusstammes BUK - TK - 300/9,2 im Rahmen der Unschädlichkeitsprüfung verlief symptomlos (94,95).

Inaktivierte Vaccinen wurden zur Unschädlichkeitsprüfung an Kaninchen in Dosen von 2 ml, 5 ml und 10 ml s.c. verimpft (1,17,25,26,28,53,54). Diese Inokulationen überlebten die Tiere symptomlos.

2.5.7. Unschädlichkeitsprüfung an Schafen und Rindern

Der Impfvirusstamm "K", der bei Kaninchen in der Unschädlichkeitsprüfung 50,5 % Verluste verursachte, wurde auch an Schafen auf seine Verträglichkeit hin getestet. Sie wurden mit 5 ml i.m. geimpft. Keines der 268 getesteten Schafe starb oder zeigte Anzeichen der Pseudowut (13). Auch bei einer Applikation von 20 ml dieser Vaccine i.m. blieben Schafe und Kälber symptomlos (6).

Das modifizierte Impfvirus B/840/III/4 a wurde erstmals in einem Mastrinderbestand zur Impfung eingesetzt. Zuerst wurden 40 Rinder mit der Vaccine geimpft und nach einer Wartezeit von 21 Tagen die restlichen 180. In diesen 21 Tagen hätten sich, wenn das Impfvirus für diese Tierart schädlich gewesen wäre, Impfschäden einstellen müssen (96).

Unschädlichkeitsuntersuchungen an Schafen und Kälbern mit inaktivierten Vaccinen wurden mit Kristallviolett- und EEI - DEAE -Dextranvaccine vorgenommen. Schafe wurden mit 20 ml und Kälber i.m. mit 10 ml geimpft und 20 Tage lange beobachtet. Bei Kälbern wurde 1 Woche zweimal täglich eine Körpertemperaturmessung vorgenommen. Beide Tierarten vertrugen die Vaccination symptomlos (34,54).

2.6. Einsatz von Pseudowutimpfstoffen bei den verschiedenen Tieren

Um einen wirksamen Schutz eines ganzen Bestandes zu erzielen, müssen Schutzimpfungen nach bestimmten Impfprogrammen vorgenommen werden.

Als Impfprogramm zur Impfung von Schweinen mit einer Lebendvaccine, die auf dem Impfvirusstamm "K" beruht, schlug Kretzschmar (41) vor:

Die Grundimmunisierung für Zucht- und Mastbetriebe besteht in einer zweimaligen Impfung innerhalb von 3 - 4 Wochen; im ersten Jahr wird in Zuchtbetrieben alle 4 Monate und im zweiten Jahr alle 6 Monate revacciniert.

Alle neu zugestellten Tiere, auch aus eigener Nachzucht, werden sofort geimpft. Ferkel mit kolostralem Immunschutz werden ab der 6. Lebenswoche geimpft und nach 3 - 4 Wochen revacciniert.

Bei einem Neuausbruch in vorher unverseuchten Beständen soll ab dem 10. Lebenstag geimpft werden.

Dieses Programm soll über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, da ein Einstellen der Impfung in einigen Betrieben nach 18 Monaten Neuausbrüche zur Folge hatte. Der Einsatz von Lebendvaccinen wird in Gebieten empfohlen, in denen eine Seuche bodenständig ist, weil man damit das natürlich vorhandene Virus allmählich durch das Impfvirus verdrängen kann.

Auf die Möglichkeit des befristeten Einsatzes eines kommerziellen Lebendimpfstoffes weisen Gasparin und Lüpcke (27) hin.

Nach dem Auftreten der Seuche wurden alle Tiere ab dem 2. Lebenstag geimpft. Nach 22 Tagen wurden sie zum zweiten Mal unter Einbeziehung aller neu geborenen Ferkel geimpft. Alle Ferkel wurden in den folgenden 10 Wochen zum Zeitpunkt des Absetzens ein drittes Mal geimpft. Mit diesem Impfschema kann man eine völlige Immunisierung aller Tiere (teils aktiv, teils passiv) gewährleisten und mit den unterstützenden Maßnahmen, wie Desinfektion und Absperrung des Betriebes, eine völlige Sanierung in etwa 10 Wochen erreichen.

Nach umfangreichen Untersuchungen über die Auswirkung der Impfung mit Lebendvaccinen vom Stamm "BUK" in der ČSSR über einen längeren Zeitraum wurde ein Rückgang der Seuchenausbrüche von 91 im Jahr 1963 auf 36 im Jahr 1966 festgestellt. Anfänglich wurden nur Notimpfungen bei drohenden Ausbrüchen und nach Erlöschen der Seuche Revaccinationen vorgenommen. Ein Jahr später traten in diesem Gebiet nicht mehr so viele Ausbrüche auf. Dazu begann man auch in bedrohten Betrieben Schutzimpfungen einzuführen, die allerdings sehr zögernd einsetzten und bei weitem nicht alle bedrohten Betriebe umfaßten.

Aus diesem Grunde waren in dieser Zeit immer wieder Seuchenausbrüche zu verzeichnen. Deshalb wurde folgendes Impfprogramm zur Bekämpfung der Pseudowut entworfen:

Mutterschweine:

1. Impfung bei Erreichen der Geschlechtsreife; Revaccination nach 2 - 4 Wochen; die Immunisierung ist zur kolostralen Immunisierung der Ferkel besonders wichtig.

Ferkel:

Aktive Immunisierung ab 20 kg Körpergewicht; Revaccination nach 2 - 4 Wochen; es werden alle Ferkel geimpft; bei drohenden Ausbrüchen zum Zeitpunkt des Absetzens.

Eber:

Impfung bei Beginn der Zuchteinstellung, Revaccination nach 2 - 4 Wochen, jährliche Wiederholungsimpfungen (73).

Ein Impfprogramm in den USA schlägt folgendes Schema vor:

Ferkel immunisierter Muttertiere:

Ab 3 - 4 Wochen, halbjährliche Revaccination.

Ferkel nicht immunisierter Muttertiere:

Ab 3. Lebenstag, halbjährliche Revaccination.

Dieses Impfprogramm soll aber nur in bedrohten bzw. verseuchten Beständen durchgeführt werden (81).

Zur Vaccination mit der inaktivierten kommerziellen Glutaraldehydvaccine mit öligen Zusätzen wird folgendes Impfprogramm vorgeschlagen:

Vaccination infizierter Tiere in lokalisierten Seuchenherden (Notimpfung)

Der ganze Bestand ist umgehend zu impfen und alle Tiere werden gleichzeitig mit 2 ml vacciniert.

Trächtige Sauen:

Sofortige Vaccination, unabhängig vom Trächtigkeitsstadium. Die Wiederholungsimpfung wird auf das Ende der Laktation verschoben (3 - 4 Tage vor dem Absetzen).

Nichtträchtige Sauen:

2 Injektionen; diese sind aber so zu legen, daß bei einer eventuellen Trächtigkeit die Zweitimpfung zwischen dem 30. und dem 60. Trächtigkeitstag liegen würde. Die Erstvaccination ist in den 8 auf die Besamung folgenden Tagen zu vermeiden.

Klinisch gesunde Ferkel:

Eine einzige Injektion im Alter von 2 Monaten, für die Zucht vorgesehene Tiere erhalten eine Wiederholungsimpfung 2 Wochen vor dem Decken.

Eber:

2 Injektionen im Abstand von 30 Tagen, es ist zu vermeiden, die Eber einige Tage nach der 2. Injektion decken zu lassen.

Vaccination in klinisch gesunden, aber bedrohten BeständenSauen:

Alle Tiere erhalten eine Injektion, ausgenommen die Tiere, welche 1 Woche vor und im ersten Monat nach dem Decken sind. Die zweite Injektion erfolgt bei nichttragenden Sauen 3 Tage vor dem Absetzen.

Ferkel:

Dasselbe Verfahren wie in kontaminierten Beständen;

Eber:

Dasselbe Verfahren wie in kontaminierten Beständen (9);

Für den Einsatz der Äthanol-inaktivierten Vaccine schlug Haralambiev et al. (28) folgendes Schema vor:

Trächtige Sauen:

Zweimalige Impfung im Abstand von einem Monat,

Ferkel:

Ab 50 Tagen zweimalige Impfung im Abstand von einem Monat;

Neu zugekaufte Sauen und Eber:

Zweimalige Impfung;

Mastschweine:

Sie sollen vor allem dann geimpft werden, wenn sie in Verbindung mit der Zuchtfarm stehen.

In der Bundesrepublik wird zur Impfung mit inaktivierter Vaccine folgendes Schema diskutiert:

Sauen:

Erstimmunisierung: 2 Injektionen im Abstand von 1 - 2 Monaten; diese Impfungen sind nicht auszuführen

- a) während der letzten fünf Wochen vor dem Abferkeln;
- b) in dem Zeitraum von 15 Tagen vor und nach dem Belegen;

Wiederholungsimpfung: Jeweils 1 Injektion im Abstand von 5 bis 6 Monaten nach der Erstimmunisierung;

Eber:

Erstimmunisierung: 2 Injektionen im Abstand von 1 - 2 Monaten;

Wiederholungsimpfung: Jeweils 1 Injektion im Abstand von 5 - 6 Monaten;

Ferkel:

Erstimmunisierung: 1 Injektion im Alter von ca. 5 Wochen;

Wiederholungsimpfung: 1 Injektion im Alter von ca. 11 Wochen;

2.7. Passive Immunisierung gegen die Pseudowut

2.7.1. Natürliche passive Immunisierung

Darunter versteht man den Immunschutz, den Neugeborene nach der Aufnahme des Kolostrums von immunisierten Sauen erwerben.

Muttersauen wurden zweimal mit 8×10^6 PFU des Impfvirusstammes "BUK" in der 200. Kulturpassage innerhalb von 3 - 4 Wochen geimpft. Sie warfen zum errechneten Zeitpunkt gesunde Ferkel. Von jedem Wurf wurden 2 Ferkel getötet und untersucht. Es konnte in keinem Fall Pseudowutvirus isoliert werden. Serologische Untersuchungen der Ferkel wurden sofort nach der Geburt, 1, 3, 7 und 14 Tage post part. vorgenommen. Neutralisierende Antikörper traten nach der Aufnahme des Kolostrums auf. Einen Tag post part. lagen die Werte der Antikörpertiter mit 1 : 64 bis 1 : 1024 am höchsten, 3 bzw. 7 Tage post part. betrugen sie 1 : 32 - 1 : 512 und 14 Tage post part. lagen die Werte zwischen 1 : 16 und 1 : 256. 13 - 14 Wochen post part. sanken die Antikörpertiter auf nicht mehr meßbare Werte. Die Antikörpertiter der Muttertiere waren im Kolostrum mit Werten zwischen 1 : 512 - 1 : 2048 durchwegs höher als im Blut (1 : 64 bis 1 : 256) (90,91).

Ferkel, deren Mütter 2 - 6 Wochen vor der Geburt ebenfalls mit dem Impfvirusstamm "BUK" immunisiert waren, wurden 7, 15, und 36 Tage post part. mit $1,6 \times 10^7$ KID₅₀ eines virulenten Pseudowutvirus i.m. belastet.

Die Tiere wiesen zu diesem Zeitpunkt neutralisierende Antikörper zwischen 1 : 2 und 1 : 32 auf. Sie überstanden die Challenge-Infektion reaktionslos im Gegensatz zu Kontrollferkeln, die von einem nicht immunisierten Muttertier stammten. Diese wurden mit 21 Tagen auf die gleiche Weise belastet. Alle 6 Ferkel erkrankten an Pseudowut, 3 von ihnen starben. Sechs 19 Tage alte Ferkel mit Antikörpertitern zwischen 1 : 2 bis 1 : 4 wurden in Gruppen zu zwei Tieren mit 5×10^5 KID₅₀ virulentem Virus i.m. bzw. i.t. und mit $2,5 \times 10^5$ KID₅₀ i.c. belastet. Die i.m. bzw. i.t. testinfizierten Ferkel reagierten 1 - 4 Tage nach der Challenge-Infektion mit einer leichten Temperaturerhöhung. 5 bis 6 Tage nach der Testinfektion starben die i.c. belasteten Tiere unter nervösen Symptomen (71). Diese Versuche und die Ergebnisse eines Feldversuchs (69) beweisen, daß mit der gezielten Immunisierung von Muttertieren mit dem Impfvirusstamm "BUK", Saugferkel, die am meisten von der Pseudowut bedroht sind, einen wirksamen Schutz vor einer Infektion besitzen.

Aber auch Ferkel von Sauen, die mit virulentem Virus des Stammes NIA - 1, 8 - 10 Wochen vor dem Decken i..n. bzw. 1 Tier zur Reinfektion i.v. infiziert wurden, hatten einen gewissen Schutz vor einer Challenge-Infektion, die 3 Tage post part. i.n. mit 0,5 ml Virussuspension ($10^{6,5}$ KID₅₀) durchgeführt wurde. Ferkel, deren Antikörpertiter größer als 1 : 380 war, überlebten in der Regel die Infektion. Allerdings schieden alle 20 Tage lang das Virus über das Respirationssystem aus. Neutralisierende Antikörper wurden bei den Muttertieren 11 Tage nach der Infektion erst-

malig nachgewiesen, sie erreichten nach 34 Tagen die höchsten Werte und blieben bis zur Geburt auf gleicher Höhe.

Die Antikörper im Kolostrum waren 11-16mal höher als im Blut. Sie fielen binnen 24 Stunden rapid ab (51).

2 Jahre nach einem Seuchenausbruch wurden 12 Mutter-schweine serologisch untersucht. Bis auf 2 Ausnahmen waren neutralisierende Antikörper im Blutserum in einer Höhe von 1 : 32 - 1 : 256 nachzuweisen. Saugferkel im Alter von 7 - 21 Tagen hatten ebenfalls Antikörpertiter zwischen 1 : 8 - 1 : 16. Daraufhin wurde in einem Fall sofort nach dem Abferkeln von den neugeborenen Ferkeln Blut gewonnen und später in unregelmäßigen Abständen wiederholt. 24 Stunden post part. stiegen die Titer auf 1 : 256, sie sanken nach 7 Tagen auf 1 : 64 und waren bis 42 Tage post part. noch in einer Höhe von 1 : 2 nachweisbar. Der Antikörpertiter des Muttertieres betrug am Tage der Geburt 1 : 512, sank am nächsten Tag auf 1 : 128 und betrug 42 Tage post part. 1 : 16. Die kolostralen Antikörper lagen gleich nach der Geburt bei 1 : 256 und persistierten in dieser Höhe einen Tag. Nach 2 Tagen betrugen sie 1 : 64 und waren 7 Tage post part. nicht mehr nachweisbar (75).

Aber nicht nur die Impfung von Muttertieren mit Lebendimpfstoffen verleiht den Saugferkeln einen passiven Immunschutz, sondern auch nach der Impfung mit inaktivierter Vaccine werden Antikörper via Kolostrum weitergegeben. Muttertiere werden 2mal zu je 2 ml mit Glutaraldehyd-inaktivierter Vaccine mit öligen Adjuvantien geimpft, und zwar zum Zeitpunkt des Deckens und 4 Wochen vor der Geburt. 12 - 14 Stunden nach der Geburt lagen die Neutralisationsindices zwischen 2,47 und 3,03 und im Kolostrum generell höher als 3,8. Die Titer der

Ferkel betrug in der 1. Woche 3,0 - 3,5, in der 2. Woche 2,6 - 3,1 und in der 3. Woche 2,6 - 2,7. Daraufhin wurden Ferkel mit 10^4 PFU virulentem Ausjeszky-Virus i.n. belastet. 95 % der Ferkel von immunisierten Muttertieren waren vor der Challenge-Infektion geschützt, während 91 % von nicht immunisierten Kontrollferkeln ihr erlagen (20).

2 mit Äthanol-inaktivierter Vaccine mit flüssigem Paraffin als Adjuvans geimpfte Mutterschweine wiesen 5 Tage vor bzw. nach dem Abferkeln Antikörper mit folgendem Neutralisationsindex auf: 4 bzw. 4,5 und nach dem Abferkeln 4,25 bzw. 4,66. Die Serumproben der Ferkel vor der Aufnahme des Kolostrums waren negativ. Im Alter von 5 Tagen betrugen die Neutralisationsindices der Ferkel 4,5 bzw. 4,84. Diese kolostrale Immunität der Saugferkel erstreckte sich über 30 - 40 Tage (28).

Zwei im Abstand von 3 Wochen mit je 50 ml der photo-inaktivierten Vaccine s.c. geimpfte trächtige Sauen warfen 2 Wochen nach der letzten Impfung. Die Ferkel einer Sau wurden sofort nach der Geburt i.n. mit 10^6 KID₅₀/ml virulentem Virus belastet. 7 von 11 Ferkeln überlebten die Challenge-Infektion mit Antikörpertitern von 5,5 und höher. Der zweite Wurf wurde 2 Tage nach der Geburt mit der gleichen Dosis testinfiziert. In diesem Fall überlebten alle Ferkel mit Titern von 1 : 73,52. Sämtliche Kontrollferkel von ungeimpften Muttertieren starben. 4 Wochen nach der Challenge-Infektion sanken die Antikörpertiter der Ferkel auf 1 : 29,86 bzw. 1 : 22,63.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde diese Vaccine vor allem zur Immunisierung trächtiger Sauen empfohlen (14).

Ebenfalls 2 trächtige Muttertiere wurden mit EEI - inaktivierter Vaccine mit DEAE - Dextran als Adjuvans (Vaccine IV) 28 Tage ante part. vacciniert bzw. revacciniert. Das einmal geimpfte Schwein hatte zum Zeitpunkt der Geburt einen Antikörpertiter von 1 : 3, das revaccinierte 1 : 20. Die Serumproben der Ferkel waren vor der Aufnahme des Kolostrums negativ. 3 Tage post part. war der Antikörpertiter der Ferkel der einmal geimpften Sau 1 : 2 - 1 : 8, während der für die andere Gruppe bei 1 : 8 - 1 : 32 lag. 30 Tage nach der Geburt konnten Antikörper nur noch bei den Ferkeln der zweimal geimpften Sau in einer Höhe von 1 : 1 - 1 : 4 nachgewiesen werden. Eine Testinfektion wurde nicht durchgeführt (76). Dieser Versuch zeigt deutlich, daß die Höhe der neutralisierenden Antikörper der Ferkel von der Höhe der maternalen Antikörper abhängt. Aus diesem Grunde ist eine zweimalige Impfung der Muttertiere zu empfehlen.

2.7.2. Künstliche passive Immunisierung

Als künstliche passive Immunisierung bezeichnet man die Verabreichung von Antikörpern an den Impfling. In den meisten Fällen wird ein Immunserum, das von Tieren stammt, die mehrmals immunisiert wurden, verwendet. Dazu werden Schweine in zweiwöchigen Intervallen mit ansteigenden Dosen von 30 - 100 ml Gewebekulturvirus zuerst s.c. und dann i.v. infiziert. Vor jeder Infektion wird Serum gewonnen und titriert, um den Anstieg der Antikörper zu verfolgen. Die Titrierung wurde sowohl in Gewebekulturen aus trypsinierten Hühnerembryonen und in weißen Mäusen durchgeführt. Dabei hat sich die Gewebekulturtitration als zuverlässiger erwiesen. Bei der Titration in Versuchstieren ergaben sich erhebliche Titterschwankungen, die in der unterschiedlichen Empfänglichkeit der benutzten Tiere gegen das Virus der Aujeszky'schen Krankheit begründet waren (61). Ebenfalls aus Schweinen wurde ein Immunserum gewonnen, das einen Titer von 1 : 256 - 1 : 1024 gegen 100 KID₅₀ Aujeszky-Virus hatte. Die Schweine wurden mit 2,5 ml Gewebekulturvirus mit einem Titer von 10^5 - 10^7 KID₅₀/ml pro kg Körpergewicht infiziert und anschließend entblutet (3).

In einem anderen Versuch wurde Schweinen Gehirnsuspension künstlich infizierter Kaninchen i.m. appliziert. Der Neutralisationstiter dieses Serums lag zwischen 1 : 64 - 1 : 256. 3 ml dieses Serums schützte Meerschweinchen vor einer Infektion nach 24 Stunden mit 10^2 LD₅₀ virulentem Virus mit

10^1 LD₅₀ infizierte Meerschweinchen überlebten zur Hälfte. Kaninchen wurde 5 ml Serum i.v. appliziert. Sie waren vor einer Infektion mit 10^3 LD₅₀ geschützt. Die Wirksamkeit dieses Serums bestätigte sich auch an 3 Monate alten Ferkeln (45). 40 kg schweren Schweinen wurde 50, 250, 500 ml Immunserum (Titer 1 : 800 gegen 100 DCP₅₀) i.v. verabreicht. 3 - 4 Stunden später wurden sie mit 0,5 ml Zellkulturvirus (ca. 5×10^5 DCP₅₀) i.c. infiziert. Nach 24 Stunden stieg die Körpertemperatur auf 40 - 41°C. Kurze Zeit nach der Infektion wurden Blutproben von den Schweinen genommen, um ihren Neutralisationstiter zu bestimmen. Er betrug - abhängig von der Inokulationsdosis des Immunserums - 1 : 10, 1 : 50 und 1 : 80. 36 Stunden nach der Infektion starb das Tier, das 50 ml Serum erhalten hatte und nach 48 Stunden die beiden anderen. Da aktiv immunisierte Schweine diese Infektionsdosis überstehen, sind die Verfasser der Meinung, daß bei einer aktiven Immunität der Verteilungsmechanismus komplexer, und unter Umständen auch nicht humorale Faktoren einen Einfluß ausüben können (66).

Schweine wurden mit 5 ml einer Al(OH)₃-Adsorbatvaccine geimpft. Die Mehrzahl der Tiere war vorher schon mit Pseudowutvirus infiziert, so daß die Impfung als Booster betrachtet werden kann. 8 - 10 Wochen später wurden sie mit 400 ml Aujeszky-Kulturvirus an FHE-Zellen (entspricht einer Virusmenge von ca. $10^{5,5}$ KID₅₀/ml) hyperimmunisiert. Vor der Hyperimmunisierung und alle 2 - 3 Tage danach wurden Blutproben

entnommen. 2 Tage nach der Hyperimmunisierung stieg der Serumantikörpergehalt von 1 : 32 auf 1 : 38 und erreichte 5 Tage später mit 1 : 430 seinen höchsten Wert. Nach weiteren 5 Tagen sank er auf 1 : 181 und stieg 4 Tage später wieder auf 1 : 304. Außerdem wurden die Blutproben elektrophoretisch auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Vor der Hyperimmunisierung war der Albumingehalt bei 34,4. Er sank nach der Hyperimmunisierung auf 30,2 und stieg im Verlauf von 2 Wochen langsam wieder auf 31,5 an. Alpha₂- und Gamma-Globuline stiegen im gleichen Zeitraum von 21,6 bzw. 22,1 auf 26,8 bzw. 22,3. Nach 2 Wochen lagen sie bei 23,2 bzw. 23,9. Beta-Globuline sanken von 21,9 auf 20,7 und stiegen dann wieder auf 21,4. Das Verhältnis Albumin/Globulin war vor der Hyperimmunisierung bei 0,52, sank auf 0,42 und erreichte nach 2 Wochen wieder 0,46. Der relativ starke Anstieg der Alpha₂-Globuline deutet auf eine akute Reaktion wie etwa eine Virämie hin.

Obwohl die Änderungen des Beta-, bzw. Gamma-Globulin-gehalts mit dem Antikörperanstieg zeitlich zusammenhängen, scheinen sie aber keine Beziehung zueinander zu haben, da bei dem zweiten Antikörperanstieg keine Änderung der beiden Globuline zu verzeichnen war. Daraus kann man schließen, daß die später auftretenden neutralisierenden Antikörper trotz ihres geringeren Molekulargewichtes genauso zusammengesetzt sind, d.h. ohne Änderung der Aminosäuresequenz wie die unspezifischen früher auftretenden Antikörper. Die unterschiedliche elektrophoretische Motilität der Globulinfraktionen beruht auf den verschiedenen Molekulargewichten (80).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Zellkulturen

Für die Virustitrationen und für den Serumneutralisationstest wurden Primärzellkulturen aus fetalen Rinderlungengeweben verwendet. Die Herstellung der Zellkultur erfolgte nach der Methode von Madin et al. (43).

Das Sediment wird gut durchpipettiert und mit folgendem Anzuchtmedium versetzt:

89,5 % Eagles "Minimal Essential Medium" (MEM),
5 % fetales Kälberserum,
5 % Lactalbuminhydrolysat, 5 %ige Lösung,
üblicher Antibiotika-Zusatz.

Dieses Medium diente auch als Erhaltungsmedium.

Die Zelleinsaat erfolgte in Industrieflaschen (80 ml/ca.200 ccm Kulturfläche). Pro Industrieflasche wurde 0,5 % des gesamten Zellsediments eingesät. Die Primärkultur wurde bei 37° C bebrütet. Nach einem Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

Herstellung von Subkulturen:

Sobald in den Industrieflaschen der Zellrasen dicht bewachsen war, wurde das Erhaltungsmedium abgegossen und ca. 20 ml Saline - Trypsin - Versen (STV) zugegeben:

10 % Saline (10 fach),
5 % Trypsinlösung (1,25 %ig),
2,5 % Versenlösung (1 %ig),
82,5 % Aqua dest.

Es erfolgte darauf eine Inkubation bei Zimmertemperatur über ca. 10 Minuten bis zur Ablösung des Zellrasens von der Glaswand. Die Zellen wurden dann bei 1200 U/min über 10 Minuten zentrifugiert und anschließend in Erhaltungsmedium suspendiert. Diese Zellsuspension wurde bei einer Teilungsrate von 1 : 2 zu je 2 ml in Röhrchen abgefüllt. Nach 1 - 2 Tagen Inkubation bei + 37°C war der Zellrasen dicht bewachsen.

3.1.2. Virusstämme

Für den Neutralisationstest wurde der Aujeszky-Virus - Stamm H2 der 10. ELK - KP (embryonale Lungenzellkultur - Passage) verwendet. Sein Titer lag bei $10^{7,5}/\text{ml}$.

Für die Challenge-Infektion der geimpften Tiere wurde der Aujeszky-Virus-Stamm H2 - NP der 3.ELK-KP verwendet. Der Titer betrug $10^{6,75}/\text{ml}$.

Die Virusstämme wurden bei -80°C gelagert.

Die Vermehrung der Virusstämme ist in dicht gewachsenen sekundären Zellkulturen aus ELK-Zellkulturen erfolgt.

Die Virusstämme wurden in Gewebekulturröhrchen titriert. Dabei wurden die Proben mit NaCl-Phosphatpuffer in 10er Potenzen verdünnt und mit je 0,1 ml der einzelnen Verdünnungsstufen auf jeweils 4 Röhrchen verimpft. Die Auswertung der Röhrchen hinsichtlich des cytopathischen Effektes (CPE) erfolgte täglich. Jedes Röhrchen mit virusspezifischem CPE wurde als positiv betrachtet.

Der Infektiositätstiter wurde nach der Methode von Spearman und Kärber (39, 78) berechnet.

3.1.3. Vaccinen

Für die vergleichenden Untersuchungen sind 12 verschieden hergestellte Pseudowut-Impfstoffe aus inaktiviertem Kulturvirus verwendet worden. Die Vaccinen unterschieden sich in folgenden Kriterien:

- 1) Art der Zellkultur, in der die Vermehrung des Virus erfolgte,
- 2) Art des Inaktivierungsmittels,
- 3) Art des Adjuvans,
- 4) Titer des Virusausgangsmaterials vor der Inaktivierung.

Einen Überblick über die geprüften Vaccinen vermittelt die Tabelle Nr.1.

Bei den Vaccinen handelt es sich sowohl um industriell wie im eigenen Institut hergestellte Versuchsimpfstoffe.

Tabelle 1

Tabellarische Übersicht über die verwendeten Aufjeszky-Vaccinen

Vacc.	Art der Zellkultur	Art des Inaktivierungsmittel	Art des Adjuvans	Art und Titer des Virusaussgangsmaterials
A	Baby-Hamster-Nierenzellen (BHK)-21-Zellen, Clon CT	0,15 % Äthylenimin (EI)	Diäthylaminoäthyl-Dextran (DEAE - D)	$1 - 5 \times 10^{7,0}$ PFU/O, 1 ml
B	Schweinenierenzellen	2 % Glutaraldehyd	multiple Ölemulsionen	10^7 KID ₅₀ /ml (Originärer Virusstamm)
C	1. Subkultur primärer ELK-Zellen	Gamma-Bestrahlung mit 1061,5 Krad	kein Adjuvans	Stamm H2 - 7. ELK - KP (Abstammung 431.FHE - KP) $10^{8,5}$ KID ₅₀ /ml
D 1	"	"	O,0625 % Saponin	Stamm H2 - 9. ELK - KP (Abstammung 431.FHE - KP) $10^{8,25}$ KID ₅₀ /ml
D 2	"	"	RAF ¹⁾ im Verhältnis 1 : 1	"
D 3	"	"	5 % Al (OH) ₃	"
D 4	"	"	kein Adjuvans	"

1) Rinderammonionflüssigkeit

Vacc.	Art der Zellkultur	Art des Inaktivierungsmittel	Art des Adjuvans	Art und Titer des Virusaussgangsmaterials
E	BHK-Zellen	Gamma-Bestrahlung mit 1061,5 Krad	O,0625 % Saponin, 2,5 % AI (OH) ₃	Stamm H2 - NP 1, ELK - KP (Abstammung niedrige Passage) 10 ^{6,25} KID ₅₀ /ml
F	"	"	"	Stamm H2 - HP, 1, ELK - KP (Abstammung 5. BHK - KP hohe Passage) 10 ^{7,5} KID ₅₀ /ml
G	"	"	"	Stamm H2 - HP, 11, ELK - KP (Abstammung 5. BHK - KP) 10 ^{7,5} KID ₅₀ /ml
H	"	"	O,0625 % Saponin 10 % AI (OH) ₃	Stamm H 2 - NP, 18, BHK - KP (Abstammung 3, ELK - KP) 10 ^{9,0} KID ₅₀ /ml
I	"	"	"	Stamm H2 - HP, 21, BHK - KP (Abstammung 1, ELK - KP) 10 ^{9,0} KID ₅₀ /ml

3.1.4. Tierversuche

Für sämtliche Tierversuche sind einheitlich aufgezogene Kaninchen (weiße Deutsche Riesen) der gleichen Versuchszucht mit einem Körpergewicht von 2-3 kg benutzt worden. Sie wurden in klimatisierten Räumen unter gleichen Bedingungen gehalten und mit Pellets gefüttert. Nach der jeweiligen Challenge-Infektion sind die testinfizierten Tiere in getrennten Räumen untergebracht worden.

Zur Überprüfung der Unschädlichkeit und Wirksamkeit der einzelnen Vaccinen wurden die Impfstoffe in der Regel s.c., teilweise auch i.m. und i.c. verabreicht. Pro s.c. und i.m. Impfung wurden 1 - 2 ml gegeben. Bei der i.c. Impfung betrug die Vaccine-menge 1 ml. Die Impfungen sind ein- bzw. zweimal durchgeführt worden. Der Abstand zwischen erster und zweiter Impfung betrug 2 - 3 Wochen.

Die Challenge-Infektionen sind in der Regel s.c., einmal auch i.m. vorgenommen worden. Der Abstand zur letzten Impfung variierte zwischen 2 - 7 Wochen.

Die Daten im einzelnen hinsichtlich der Menge und Applikationsart sind aus den Tabellen Nr. 2 - 7 der betreffenden Abschnitte des Kapitels 3.2. zu entnehmen.

Sämtliche Tiere wurden klinisch nach der Impfung bzw. Challenge-Infektion täglich überwacht.

3.1.5. Antikörpernachweis

Die Tiere sind vor der Impfung, zu bestimmten Zeiten nach der Impfung und z.T. nach der Challenge-Infektion auf den Gehalt virusneutralisierender Serum-Antikörper untersucht worden. Die Daten über den Zeitpunkt der Blutentnahmen sind aus den einzelnen Abschnitten des Kapitels 3.2. zu entnehmen.

Die Blutentnahmen und die Serumgewinnung erfolgten nach den bekannten Methoden (48). Bis Versuchsbeginn wurden die Seren bei -20°C gelagert.

Vor Versuchsbeginn wurden die Seren über $1/2$ Stunde im Wasserbad bei $+56^{\circ}\text{C}$ inaktiviert.

Zum Nachweis der virusneutralisierenden Antikörper diente die Methode des Serum-Neutralisationstestes (SNT) nach den bekannten Verfahren (49).

Als Testvirus kam der Pseudowut-Virusstamm H2 - 10. ELK - KP, Titer $10^{7,5}/\text{ml}$ in der Gebrauchsverdünnung $1 : 2$ der Verdünnungsstufe 10^5 zur Verwendung. Die Virusgebrauchsdosis enthielt ca. $100 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$.

Vor Ansatz der "in vitro-Gemische" aus Virusgebrauchsdosis und Serumverdünnung zu gleichen Teilen, ist der Virusgebrauchsdosis 5 % Meerschweinchen-Komplement zugesetzt worden. Die Verdünnung der Seren erfolgte in 2er Potenzen. Die Bindungszeit der Gemische betrug 2 Stunden im Wasserbad bei 37°C .

Die Auswertung der in-vitro Gemische ist in Zellkulturen (Röhrchen) aus sekundären ELK-Zellen durchgeführt worden. Pro Neutralisationsgemisch wurden 0,2 ml pro Röhrchen verimpft. Pro Serumverdünnung sind 4 Röhrchen eingesetzt worden. Die Auswertung erfolgte nach der Methode von Spearman und Kärber (39, 78).

Folgende Kontrollen liefen in allen Neutralisationstesten parallel:

- 1) Jedes Serum wurde auf eine etwaige Zelltoxizität hin untersucht und zu diesem Zweck in der Verdünnung 1 : 2 verimpft.
- 2) Als negative Serumkontrollen wurden Null-Seren von Kaninchen in den Verdünnungen 1 : 2 bis 1 : 32 benutzt.
- 3) Als positive Serumkontrollen dienten Schweine- bzw. Kaninchen-Immunseren in den Verdünnungen 1 : 2 bis 1 : 512.
- 4) Zellkulturkontrolle ohne Beimpfung.
- 5) Viruskontrolle 1: Die Virusgebrauchsdosis wurde in der Verdünnung 1 : 2 auf die Zellkultur verimpft und auf einen cytopathischen Effekt überprüft.
- 6) Viruskontrolle 2: Von der Virusgebrauchsdosis sind Verdünnungen von 1 : 8 bis 1 : 256 angelegt und auf die Zellkultur zur Überprüfung des Virusgehaltes verimpft worden.

3.2. Ergebnisse

Bei den verschiedenen Impfversuchen wurde jeweils nur ein Parameter verändert, während die anderen Gegebenheiten gleich blieben. Die Ergebnisse dieser vergleichenden Untersuchungen sind in den Tabellen 2 - 9 zusammengefaßt. Die wesentlichen Informationen betreffen dabei:

1. die Anzahl der erfolgten Impfungen,
2. die Applikationsart und die Impfdosis,
3. die Immunitätslage nach der Challenge-Infektion.

Sämtliche überprüften Vaccinen erwiesen sich für das Kaninchen als unschädlich. Nichtinaktiviertes Restvirus war in keinem Impfstoff vorhanden.

Kein Kaninchen hatte vor den Impfungen Antikörper gegen die Pseudowut.

Lokale oder allgemeine Reaktionen traten nach der Schutzimpfung nicht auf.

Zunächst sollte in einem orientierenden Versuch geprüft werden, ob sich Kaninchen durch eine einmalige Impfung mit einem Zellkulturimpfstoff (über Gammabestrahlung inaktiviert), der keinerlei Adjuvans enthält (Vaccine C), immunisieren lassen, wobei die Testinfektion 7 Wochen nach der Immunisierung erfolgte. Der Impfstoff wurde in einer Menge von 1 ml i.c. bzw. s.c. mit unverdünnter Vaccine und s.c. mit 1 : 8 verdünnter Vaccine verimpft.

Die Dosis der Belastungsinfektion betrug
1000 KID₅₀/ml.

Als Kontrollen dienten 2 gleichaltrige Kaninchen,
die zum Zeitpunkt der Challenge-Infektion ohne Vor-
immunisierung Virus i.m. erhielten.

Von 4 i.c. immunisierten Tieren überstand 1 Tier
die Challenge-Infektion. Die anderen Tiere star-
ben 4 Tage nach der Belastungsinfektion.

Alle 7 s.c. (mit unverdünnter bzw. 1 : 8 ver-
dünnter Vaccine) geimpften Tiere starben 3 - 4
Tage nach der Challenge-Infektion.

Die nichtgeimpften Kontrolltiere erlagen der
Challenge-Infektion ebenfalls nach 4 Tagen. Die
Ergebnisse des Vorversuches sind in Tabelle 2 zu-
sammengefaßt.

Für den negativen Ausfall des orientierenden Vor-
versuchs sind möglicherweise folgende Faktoren ver-
antwortlich zu machen:

1. Impfstoff ohne Adjuvans,
2. nur 1 ml Impfmenge,
3. Abstand zwischen Impfung und Challenge,
4. 1000 KID₅₀/ml Belastungsinfektion,
5. Vermehrung des Virus in embryonalen Lungenzellen,
6. Titer des Virusausgangsmaterials zu gering,
7. Kaninchen ungeeignet.

Aufgabe der folgenden Versuche war es abzuklären,
inwieweit die oben angegebenen Faktoren für die

Wirksamkeitsprüfung von Aujeszky-Impfstoffen aus
inaktiviertem Virus in Kaninchen von Bedeutung
sind.

Tabelle 2

Ergebnisse des Vorversuches nach einmaliger Impfung von Kaninchen mit Versuchsvaccine C

Impfstoffmenge 1 mL, Challenge 7 Wochen nach der Impfung mit 1000 KID₅₀/mL i.m.

Tier- zahl	Applikation des Impfstoffes	Ergebnis der Challenge- Infektion	Antikörperbildung
4	i.c. mit unver- dünnter Vaccine	1 Tier überlebte, 3 Tiere nach 4 Tagen gestorben	1 Woche post vacc.: negativ ¹⁾ 3 Wochen post vacc.: negativ - 1 : 6,71 6 Wochen post vacc.: negativ - 1 : 7,98 1 Tier serologisch negativ
3	s.c. mit unver- dünnter Vaccine	3 Tiere nach 4 Tagen gestorben	1 Woche post vacc.: negativ 3 Wochen post vacc.: negativ - 1 : 5,65 6 Wochen post vacc.: negativ - 1 : 5,65 1 Tier serologisch negativ
4	s.c. mit 1 : 8 ver- dünnter Vaccine	4 Tiere nach 3 - 4 Tagen gestorben	1 Woche post vacc.: negativ 3 Wochen post vacc.: negativ - 1 : 5,54 6 Wochen post vacc.: negativ - 1 : 4,75 3 Tiere serologisch negativ
2	Kontrollen ohne Impfung	2 Tiere 4 Tage nach Be- lastung mit 1000 KID ₅₀ /mL gestorben	

1) bezieht sich auf die Serumverdünnung 1 : 2; unverdünntes Serum wurde nicht untersucht.

3.2.1. Bedeutung des Adjuvans für die Wirksamkeit der Vaccinen

Folgende Adjuvantien sind auf ihre Wirksamkeit überprüft worden: Saponin, RAF und Al (OH)₃; als Impfstoff wurde eine aus embryonalen Kälberlungenzellen hergestellte Vaccine benutzt (Vaccine D 1, D 2, D 3). Zum Vergleich ist diese Vaccine ohne Adjuvans (D 4) getestet worden.

Mit jeder Vaccine-Adjuvans-Variation wurden 4 Kaninchen zweimal im Abstand von 3 Wochen mit 2 ml s.c. geimpft und 4 Wochen nach der 2. Impfung mit 100 KID₅₀/ml s.c. belastet. Alle mit Vaccine D 1 und D 2 geimpften Tiere starben 4 - 6 Tage nach der Testinfektion und je eines der mit Vaccine D 3 und D 4 geimpften Tiere überlebte.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Keines der untersuchten Adjuvantien verbesserte in der jeweiligen Konzentration die Wirksamkeit der Vaccinen. Auch bezüglich Antikörperproduktion traten keine signifikanten Unterschiede auf. Die Ergebnisse ließen vermuten, daß der Impfstoff aus embryonalen Lungenzellen vom Kalb sui generis für eine Schutzimpfung von Kaninchen gegen die Pseudowut ungeeignet ist. Daneben konnten auch Abstand der Impfungen zueinander und Abstand der Challenge-Infektion zur zweiten Impfung von Bedeutung sein.

Schließlich mußte auch der Virusausgangstiter der jeweiligen Impfstoffe berücksichtigt werden.

Die Höhe der Challenge-Infektion war aufgrund der Erfahrungen der Vorversuche bereits auf 100 KID₅₀/ml reduziert worden.

In den folgenden Versuchen wurden einheitlich Al (OH)₃ in höherer Konzentration und Saponin als Adjuvans zugesetzt.

Ergebnisse nach zweimaliger Impfung von Kaninchen mit und ohne Adjuvantien; Vaccinen D 1 / D 2 / D 3 / D 4 (Impfstoffe aus embryonalen Lungenkulturen von Kalb)

Impfstoffmenge 2 ml, s.c. zweimalige Impfung im Abstand von 3 Wochen
Belastungsinfektion 4 Wochen nach der 2. Impfung mit 100 KID₅₀/ml

Tier- zahl	Art des Adjuvans	Ergebnis der Challenge- Infektion	Antikörperbildung
4	0,0625 % Saponin, Vaccine D 1	4 Tiere nach 5 - 6 Tagen gestorben	3 Wochen nach der 1. Impfung: negativ 3 Wochen nach der 2. Impfung: 1 : 10,38 - 1 : 20,76
4	RAF im Verhältnis 1 : 1 zur Vaccine Vaccine D 2	4 Tiere nach 4 - 6 Tagen gestorben	3 Wochen nach der 1. Impfung: negativ 3 Wochen nach der 2. Impfung: 1 : 5,19 - 1 : 23,05
4	5 % AL (OH) ₃ Vaccine D 3	1 Tier überlebte, 3 Tiere nach 5 - 7 Tagen gestorben	3 Wochen nach der 1. Impfung: negativ 3 Wochen nach der 2. Impfung: <1 : 3,20 - 1 : 18,71
4	Kontrollen ohne Adjuvans Vaccine D 4	1 Tier überlebte, 3 Tiere nach 4 - 6 Tagen gestorben	3 Wochen nach der 1. Impfung negativ - 1 : <2,46 3 Wochen nach der 2. Impfung <1 : 3,94 - 1 : >37,43
3	Kontrollen ohne Impfung	3 Tiere 4 Tage nach Belastung mit 100 KID ₅₀ /ml gestorben	-

3.2.2. Einfluß des bei der Virusproduktion benutzten Zellsystems auf die Wirksamkeit der Vaccine

Anstelle der Zellkulturen aus embryonalen Lungen vom Kalb, sind für die Virusvermehrung BHK - Kulturen benutzt worden. Nach einigen Adaptierungspassagen vermehrte sich das Pseudowut-Virus sehr gut in diesem Zellsystem. Die erreichten Titer entsprachen durchaus denen im ersten System. Mit Einsatz der BHK - Vaccinen verbesserte sich die Wirksamkeit grundlegend. Es wurden Schutzquoten bis zu 80 % erreicht. Der Abstand der zweimaligen Impfungen betrug 14 Tage. Die Belastungsinfektion wurde 2 Wochen nach der letzten Impfung mit ca. $100 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$ durchgeführt. Insgesamt wurden 5 BHK-Vaccinen, deren Virusausgangsgehalt von $10^{6,25}$ - $10^{9,0} \text{ KID}_{50}/\text{ml}$ schwankte, auf ihre Wirksamkeit bei je 6 bzw. 5 Kaninchen untersucht. Die Impfungen erfolgten im zweiwöchigen Abstand und nach weiteren 2 Wochen wurden die Tiere mit $50 - 80 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$ testinfiziert. Als Adjuvans diente 2,5 % Al (OH)₃ für Vaccine E, F, G, für Vaccine H und I wurde die Menge auf 10 % erhöht. Der Gehalt an Saponin war für alle Vaccinen mit 0,0625 % identisch. Je 2 mit Vaccine E, F und I geimpften Tiere starben 5 - 6 Tage nach dem Challenge. 3 der 6 mit Vaccine G geimpften Tiere starben 8 - 10 Tage und eines der 5 mit Vaccine H vaccinierten starb 16 Tage nach der Testinfektion. Alle nicht geimpften Kontrolltiere starben 4 bis 5 Tage nach der Testinfektion.

Wesentlich war nun die Frage, ob ein unterschiedlicher Virusausgangshalt der Impfstoffe die Ergebnisse verändert.

Für die Wirksamkeit eines Impfstoffes ist generell ein Mindestgehalt an Virus in der Vaccine notwendig. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen allerdings, daß eine Erhöhung des Virusausgangshaltes für eine erfolgreiche Immunisierung von Kaninchen gegen die Pseudowut nicht entscheidend ist.

Serologisch reagierten die Tiere in der Regel bereits nach der 1. Impfung. Nach der Revaccination stieg der Antikörpertiter weiter an. Interessant war aber, daß 5 Wochen nach der Testinfektion die Serumantikörper bereits wieder einen abfallenden Trend zeigten. Zudem reagierten die Kaninchen serologisch sehr uneinheitlich. Insgesamt bewiesen die Versuche, daß Kaninchen zwar serologisch auf die Impfung reagierten, die Titer aber stets sehr niedrig sind und sich nicht lange halten.

(Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt).

Tabelle 4

Ergebnisse nach zweimaliger Impfung von Kaninchen mit BKV-Vaccinen bei verschiedenem Virusaussangsgehalt

Impfabstand 2 Wochen, 2 Wochen nach der letzten Impfung Challenge mit 50 - 80 KID₅₀/ml

Tier-zahl	Virusaussangsgehalt der Vaccinen	Ergebnis der Challenge-Infektion	Antikörperbildung
6	Vaccine E: 10 ^{6,25} KID ₅₀ /ml	4 Tiere überlebten, 2 nach 5 Tagen gestorben	2 Wochen nach 1. Impfung: 1 : 1,68 - > 1 : 6,40
			2 Wochen nach 2. Impfung: 1 : 3,99 - 1 : 41,53
			5 Wochen nach Challenge: < 1 : 4,68 - 1 : 17,77
6	Vaccine F: 10 ^{7,5} KID ₅₀ /ml	4 Tiere überlebten, 2 nach 6 Tagen gestorben	2 Wochen nach 1. Impfung: neg. - > 1 : 6,40
			2 Wochen nach 2. Impfung: 1 : 3,99 - > 1 : 51,16
			5 Wochen nach Challenge: < 1 : 6,07 - 1 : 37,43
6	Vaccine G: 10 ^{7,5} KID ₅₀ /ml	3 Tiere überlebten, 3 Tiere nach 8 - 10 Tagen gestorben	2 Wochen nach 1. Impfung: neg. - 1 : 6,40
			2 Wochen nach 2. Impfung: 1 : 6,71 - 1 : 20,76
			5 Wochen nach Challenge: neg. - < 1 : 5,47
5	Vaccine H: 10 ^{9,0} KID ₅₀ /ml	4 Tiere überlebten, 1 Tier nach 16 Tagen gestorben	nicht untersucht
6	Vaccine I: 10 ^{9,0} KID ₅₀ /ml	4 Tiere überlebten, 2 Tiere nach 6 Tagen gestorben	nicht untersucht
14	Kontrollen ohne Impfung	14 Tiere 4 - 5 Tage nach Belastung von 50-80 KID ₅₀ /ml gestorben	

3.2.3. Einfluß der Impfmenge und des Zeitabstandes zwischen zweiter Impfung und Challenge

Je 4 Kaninchen wurden zweimal im Abstand von 3 Wochen mit Vaccine D 4 mit 1 ml bzw. 2 ml geimpft. Die Tiere, welche pro Impfdosis 1 ml erhielten, wurden 3 Wochen nach der letzten Impfung und die Gruppe, die 2 ml pro Impfung erhielt, 4 Wochen nach der letzten Impfung testinfiziert. Von jeder Gruppe überlebte je 1 Tier, während 6 Tiere 4 bis 7 Tage nach der Belastungsinfektion starben. (Siehe Tabelle 5)

Auch diese Untersuchungen weisen daraufhin, daß sich Kaninchen sehr schwer immunisieren lassen. Für Wirksamkeitsteste müssen die Abstände zwischen den Immunisierungen und auch zwischen letzter Immunisierung und Challenge so kurz wie möglich sein. Ein dreiwöchiger Abstand scheint jedenfalls zu lange zu sein.

Zur Kritik muß angeführt werden, daß es sich bei den in diesen Versuchen benutzten Vaccinen um Impfstoffe aus embryonalen Kälberlungenzellen gehandelt hat, die, wie sich in den vorigen Versuchen gezeigt hat, zur Immunisierung von Kaninchen weniger geeignet sind.

Tabelle 5

Ergebnisse nach zweimaliger Impfung von Kaninchen mit ETK-Vaccine D 4 mit verschiedenen Impfdosen und
Zeitabständen zwischen letzter Impfung und Challenge

Challengedosis 100 KID₅₀/ml

Tier- zahl	Impfmenge und Zeitabstand zwischen letzter Impfung und Challenge	Ergebnis des Challenge	Antikörperbildung
4	1 ml, 3 Wochen zwischen letzter Impfung und Challenge	1 Tier überlebte, 3 Tiere nach 5 - 7 Tagen gestorben	3 Wochen nach 1. Impfung: negativ 3 Wochen nach 2. Impfung: 1 : 6,71 - 1 : 13,42
4	2 ml, 4 Wochen zwischen letzter Impfung und Challenge	1 Tier überlebte, 3 Tiere nach 4 - 6 Tagen gestorben	3 Wochen nach 1. Impfung: negativ - <1 : 2,34 3 Wochen nach 2. Impfung: <1 : 3,94 - >1 : 37,32
5	<u>Kontrollen</u> ohne Impfung	5 Tiere 4 - 5 Tage nach Be- lastung mit 100 KID ₅₀ /ml gestorben	

3.2.4. Beziehung zwischen Stärke der Belastungs- infektion und Wirksamkeit der Vaccinen

Zur Klärung dieses Problems wurden Belastungsversuche vergleichend bei geimpften und nicht geimpften Tieren durchgeführt (siehe Tabelle 6). Je 4 mit Vaccine D 4 geimpfte und je 2 nicht geimpfte Kaninchen wurden mit 10 KID₅₀/ml, 100 KID₅₀/ml und 1000 KID₅₀/ml 3 Wochen nach der 2. Impfung infiziert.

Eine Belastung mit 10 KID₅₀/ml erwies sich für die Prüfung von Pseudowutvaccinen beim Kaninchen als zu gering. Die Kontrolltiere reagierten nur mit einer Temperaturerhöhung, starben aber nicht.

Die nichtgeimpften und zwei geimpfte Kaninchen starben 5 Tage nach der Belastungsinfektion mit 100 KID₅₀/ml. Ein drittes geimpftes Tier verendete nach 7 Tagen.

Der Belastungsinfektion mit 1000 KID₅₀/ml erlagen die beiden Kontrolltiere nach 4 Tagen und 2 der 4 geimpften Tiere nach 5 Tagen.

Die Ergebnisse mit Belastungsdosen zwischen 100 und 1000 KID₅₀/ml erlauben keine Aussage, da die Tierzahlen zu gering sind, zudem auch in diesen Testen Vaccinen aus embryonalen Kälberlungenzellen eingesetzt wurden, die Kaninchen schlecht immunisieren.

Da alle Kontrolltiere bereits nach einer Belastung mit 100 KID₅₀/ml starben, bietet sich diese Challenge-Infektionsdosis bei Kaninchen für Routineprüfungen an.

Tabelle 6

Ergebnisse nach zweimaliger Impfung von Kaninchen mit EK-Vaccine D 4 mit verschiedenen Belastungsdosen

Tier- zahl	Belastungsdosen	Ergebnis des Challenge	Antikörperbildung
4	10 KID ₅₀ /ml	alle Tiere überlebten	3 Wochen nach 1. Impfung: negativ - 1 : 1,68 3 Wochen nach 2. Impfung: negativ - 1 : 5,65
4	100 KID ₅₀ /ml	1 Tier überlebte, 3 nach 5 - 7 Tagen gestorben	3 Wochen nach 1. Impfung: negativ 3 Wochen nach 2. Impfung: 1 : 6,71 - 1 : 13,42
4	1000 KID ₅₀ /ml	2 Tiere überlebten, 2 nach 5 Tagen gestorben	3 Wochen nach 1. Impfung: negativ - 1 : 3,99 3 Wochen nach 2. Impfung: <1 : 3,04 - 1 : 6,71
Kontrollen ohne Impfung			
2	10 KID ₅₀ /ml	alle Tiere überlebten	-
2	100 KID ₅₀ /ml	alle Tiere nach 5 Tagen gestorben	-
2	1000 KID ₅₀ /ml	alle Tiere nach 4 Tagen gestor- ben	-

3.2.5. Vergleichende Auswertung aller getesteten Vaccinen bezüglich Wirksamkeit beim Kaninchen

Es wurden insgesamt 10 über Gammabestrahlung inaktivierte Vaccinen getestet, 5 ELK-Vaccinen (C, D 1, D 2, D 3, D 4) und 5 BHK-Vaccinen (E, F, G, H und I). Die beste immunisierende Wirksamkeit konnte nach zweimaliger Impfung mit BHK-Vaccinen erreicht werden. Von 29 geimpften Tieren überlebten 19 die Testinfektion: dies ergibt einen Schutz von 65,5 %. Nach zweimaliger Impfung mit ELK-Vaccinen - allerdings mit längeren Impfintervallen - überlebten von 24 geimpften Tieren 5 die Belastungsinfektion = 20,8 %. Von 11 einmal mit Vaccine C immunisierten Tieren überlebte 1 Tier die Testinfektion 7 Wochen nach der Impfung.

Neben diesen 10 Test-Vaccinen sind 2 Gebrauchs-Vaccinen (A und B) am Kaninchen auf ihre Wirksamkeit untersucht worden. Mit Vaccine A (mit Äthylenimin inaktiviert und DEAE-Dextran als Adjuvans) wurden 5 Tiere zweimal im Abstand von 2 Wochen mit 2 ml i.m. geimpft und nach weiteren 2 Wochen einer Challenge-Infektion mit 100 KID₅₀/ml unterzogen. Keines der geimpften Tiere überlebte die Belastungsinfektion. Vaccine B (Glutaraldehyd-inaktiviert mit multipler Ölemulsion als Adjuvans) wurde an 6 Tiere nach dem gleichen Schema verimpft. Alle geimpften Tiere überlebten die Testinfektion (siehe Tabelle 7).

Eine Beziehung zwischen der Antikörperbildung und dem Schutz vor der Challenge-Infektion ließ sich in keinem Versuch signifikant nachweisen.

Tabelle 7

Immunisierungsergebnisse beim Kaninchen gegen die Pseudotub mit verschiedenen Vaccinen aus inaktiviertem Virus

Vaccine und An- zahl der Tiere	Impfung		Challenge		Ergebnis	Antikörperbildung	
	Zeitpunkt	Appl.-Art und Menge	Zeitpunkt	Appl.-Art und Menge		Zeitpunkt	NT - Titer
Vacc. C 4 Tiere	einemalige Impfung	1 ml, i.c.	nach 7 Wo- chen	1000 KID ₅₀ /ml, 1 ml, i.m.	1 Tier über- lebt, 3 Tie- re nach 4 Tagen ge- storben	1 Woche nach d. Impfung	negativ
						3 Wochen nach d. Impfung	negativ - 1 : 6,71
						6 Wochen nach d. Impfung	negativ - 1 : 7,98
Vacc. C 3 Tiere	einemalige Impfung	1 ml, s.c.	nach 7 Wo- chen	1000 KID ₅₀ /ml, 1 ml, i.m.	alle Tiere nach 4 Tagen gestorben	1 Woche nach d. Impfung	negativ
						3 Wochen nach d. Impfung	negativ - 1 : 5,65
						6 Wochen nach d. Impfung	negativ - 1 : 5,65
Vacc. C 4 Tiere	einemalige Impfung	1 ml, s.c. Vaccine 1:8 verdünnt	nach 7 Wo- chen	1000 KID ₅₀ /ml, 1 ml, i.m.	alle Tiere nach 4 Tagen gestorben	1 Woche nach d. Impfung	negativ
						3 Wochen nach d. Impfung	negativ - 1 : 5,45
						6 Wochen nach d. Impfung	negativ - 1 : 4,75
Vacc. D 1 4 Tiere	zweimal im Abstand v. 3 Wochen	2 ml, s.c.	4 Wochen nach der 2. Impfung	100 KID ₅₀ /ml 1 ml, s.c.	alle Tiere nach 4 Tagen gestorben	3 Wochen nach d. 1. Impfung	negativ
						3 Wochen nach d. 2. Impfung	1 : 10,38 - 1 : 20,76

Vaccine und An- zahl der Tiere	Impfung		Challenge			Antikörperbildung	
	Zeitpunkt	Appl.-Art und Menge	Zeitpunkt	Appl.-Art und Menge	Ergebnis	Zeitpunkt	NT - Titer
Vacc.D 2 4 Tiere	zweimal im Abstand v. 3 Wochen	2 ml, s.c.	4 Wochen nach der 2. Impfung	100 KID ₅₀ /ml, 1 ml, s.c.	alle Tiere nach 4 Tagen gestorben	3 Wochen nach d.1. Impfung	negativ
						3 Wochen nach d.2. Impfung	1 : 5,76 - > 1 : 23,05
Vacc.D 3 4 Tiere	zweimal im Abstand v. 3 Wochen	2 ml, s.c.	4 Wochen nach der 2. Impfung	100 KID ₅₀ /ml, 1 ml, s.c.	1 Tier über- lebt, 3 Tiere nach 5-7 Ta- gen gestorben	3 Wochen nach d.1. Impfung	negativ
						3 Wochen nach d.2. Impfung	< 1 : 3,20 - 1 : 18,71
Vacc.D 4 4 Tiere	zweimal im Abstand v. 3 Wochen	2 ml, s.c.	4 Wochen nach der 2. Impfung	100 KID ₅₀ /ml, 1 ml, s.c.	1 Tier über- lebt, 3 Tiere nach 4-6 Ta- gen gestorben	3 Wochen nach d.1. Impfung	negativ - 1 : 2,34
						3 Wochen nach d.2. Impfung	< 1 : 3,94 - > 1 : 37,43
Vacc.D 4 4 Tiere	zweimal im Abstand v. 3 Wochen	1 ml, s.c.	3 Wochen nach der letzten Impfung	10 KID ₅₀ /ml, 1 ml, s.c.	alle (auch Kontrolltiere) überlebt	3 Wochen nach d.1. Impfung	negativ - 1 : 1,68
						3 Wochen nach d.2. Impfung	negativ - 1 : 5,65
Vacc.D 4 4 Tiere	zweimal im Abstand v. 3 Wochen	1 ml, s.c.	3 Wochen nach der letzten Impfung	100 KID ₅₀ /ml, 1 ml, s.c.	1 Tier über- lebt, 3 Tiere nach 5-7 Ta- gen gestorben	3 Wochen nach d.1. Impfung	negativ
						3 Wochen nach d.2. Impfung	1 : 6,71 - 1 : 13,42

Vaccine und An- zahl der Tiere	Impfung		Challenge		Ergebnis	Antikörperbildung	
	Zeitpunkt	Appl.-Art und Menge	Zeitpunkt	Appl.-Art und Menge		Zeitpunkt	NT - Titer
Vacc. D 4 4 Tiere	zweimal im Abstand von 3 Wochen	1 mL, s.c.	3 Wochen nach der letzten Impfung	1000 KID ₅₀ /mL, 1 mL, s.c.	2 Tiere über- lebt, 2 Tie- re nach 4-5 Tagen ge- storben	3 Wochen nach d. 1. Impfung 3 Wochen nach d. 2. Impfung	negativ - 1 : 3,99 1 : 3,04 - 1 : 6,71
Vacc. E	zweimal im Abstand von 2 Wochen	2 mL, i.m.	2 Wochen nach der letzten Impfung	50 KID ₅₀ /mL, 1 mL, s.c.	4 Tiere über- lebt, 2 Tie- re nach 5 Tagen gestorben	2 Wochen nach d. 1. Impfung 2 Wochen nach d. 2. Impfung 5 Wochen nach Challenge	1 : 1,68 - 1 : 6,40 1 : 3,94 - 1 : 41,53 1 : 4,68 - 1 : 17,77
Vacc. G 6 Tiere	zweimal im Abstand von 2 Wochen	2 mL, i.m.	2 Wochen nach der letzten Impfung	50 KID ₅₀ /mL, 1 mL, s.c.	3 Tiere über- lebt, 3 Tiere nach 8-10 Ta- gen gestorben	2 Wochen nach d. 1. Impfung 2 Wochen nach d. 2. Impfung 5 Wochen nach Challenge	negativ - 1 : 6,40 1 : 6,71 - 1 : 15,96 negativ - 1 : 5,47
Vacc. F 6 Tiere	zweimal im Abstand von 2 Wochen	2 mL, i.m.	2 Wochen nach der letzten Impfung	50 KID ₅₀ /mL, 1 mL, s.c.	4 Tiere über- lebt, 2 Tiere nach 6 Tagen gestorben	2 Wochen nach d. 1. Impfung 2 Wochen nach d. 2. Impfung 5 Wochen nach Challenge	negativ - 1 : 6,40 1 : 3,99 - 1 : 51,16 1 : 6,07 - 1 : 37,43
Vacc. H 5 Tiere	zweimal im Abstand von 2 Wochen	2 mL, i.m.	2 Wochen nach der letzten Impfung	50 - 80 KID ₅₀ /mL, 1 mL, s.c.	4 Tiere über- lebt, 1 Tier nach 16 Tagen gestorben	nicht untersucht	

Vaccine und An- zahl der Tiere	Impfung		Challenge		Antikörperbildung	
	Zeitpunkt	Appl.-Art und Menge	Zeitpunkt	Appl.-Art und Menge	Ergebnis	Zeitpunkt NT - Titer
Vacc. I 6 Tiere	zweimal im Abstand v. 2 Wochen	2 ml, i.m.	2 Wochen nach der letzten Impfung	50 - 80 KID ₅₀ /ml, 1 ml, s.c.	4 Tiere über- lebt, 2 Tiere nach 6 Tagen gestorben	nicht untersucht
Vacc. B 6 Tiere	zweimal im Abstand v. 2 Wochen	2 ml, i.m.	2 Wochen nach der letzten Impfung	100 KID ₅₀ /ml, 1 ml, s.c.	alle überlebt	2 Wochen nach d.1. Impfung 1 : 2,0 - 1 : 23,05
						2 Wochen nach d.2. Impfung 1 : 22,56 - 1 : 157,70
						6 Wochen nach Challenge 1 : 5,47 - 1 : 142,12
Vacc. A 5 Tiere	zweimal im Abstand v. 2 Wochen	2 ml, i.m.	2 Wochen nach der letzten Impfung	100 KID ₅₀ /ml, 1 ml, s.c.	alle gestorben	2 Wochen nach d.1. Impfung negativ
						2 Wochen nach d.2. Impfung negativ - 1 : 15,95

Das einzige mit Vaccine C geimpfte Tier, das die Testinfektion überlebte, hatte zu keinem untersuchten Zeitpunkt neutralisierende Antikörper gebildet, während bei den Tieren, die die Belastungsinfektion nicht überlebten, 3 Wochen nach der Impfung die Titer zwischen negativ und 1:6,71 und 6 Wochen nach der Impfung zwischen negativ und 1:7,98 lagen.

Revaccinationen erbrachten in den meisten Fällen einen deutlichen Anstieg der Antikörper (siehe Tabellen 8 und 9).

Die mit Vaccinen E und G geimpften Tiere, die die Challenge-Infektion nicht überlebten, hatten nach der Revaccination mit 1:7,98 bis 1:41,53 bzw.

$<1:7,48$ bis $1:20,76$ höhere Titer als die Tiere, die vor der Testinfektion geschützt waren ($1:3,99$ bis $>1:26,96$ bzw. $1:6,71$ bis $1:15,96$).

Daß dieses Ergebnis in keinem Zusammenhang mit dem benützten Zellsystem steht, zeigen die Impfversuche mit Vaccine D 4. Hier waren nach der Revaccination die Antikörpertiter der Tiere, die die Challenge-Infektion überstanden, mit negativ bis 1:10,38 bedeutend niedriger als bei den Tieren, die sie nicht überlebten ($1:3,94$ bis $>1:37,43$).

Bei den Impfversuchen mit Vaccine D 3 und F hingegen wiesen die immunen Tiere mit 1:18,71 bzw. mit 1:3,99 bis $>1:51,16$ höhere Antikörpertiter auf als die Kaninchen, die auf die Testinfektion hin starben ($<1:3,20$ bis $1:11,53$ bzw. $1:5,65$ bis $1:23,05$).

Antikörperbildung bei Kaninchen, die nach Immunisierung mit Ajjeszky-Vaccine eine Testinfektion überlebten

Vaccine	Titer nach der 1. Impfung				Titer nach der 2. Impfung		Titer nach dem Challenge	
	1 Woche	2 Wochen	3 Wochen	6 Wochen	2 Wochen	3 Wochen	5 Wochen	6 Wochen
B	-	1:2,0 - > 1:23,05	-	-	1:22,56 - 1:157,70	-	-	< 1:5,47 - 1:142,12
C	negativ	-	negativ	negativ	-	-	-	-
D 3	-	-	negativ	-	-	1:18,71	-	-
D 4	-	-	neg. - 1:1,68	-	-	neg. - 1:10,38	-	-
E	-	1:1,68 - > 1:6,40	-	-	1:3,99 - > 1:26,96	-	< 1:4,68 - 1:17,77	-
F	-	neg. - > 1:6,40	-	-	1:3,99 - > 1:51,16	-	< 1:6,40 - 1:37,43	-
G	-	neg. - 1:3,99	-	-	1:6,71 - 1:15,96	-	neg. - < 1:5,47	-

Tabelle 9

Antikörperbildung bei Kaninchen, die nach Immunisierung mit Aujeszky-Vaccine eine Testinfektion nicht überleben

Vaccine	Titer nach der 1. Impfung				Titer nach der 2. Impfung		Titer nach dem Challenge	
	1 Woche	2 Wochen	3 Wochen	6 Wochen	2 Wochen	3 Wochen	5 Wochen	6 Wochen
A	-	negativ	-	-	neg. - 1 :15,95	-	-	-
C	negativ	-	neg. - 1:6,71	neg. - 1:7,98	-	-	-	-
D 1	-	-	negativ	-	-	1:10,38-1:20,76	-	-
D 2	-	-	negativ	-	-	1:5,19-1:23,05	-	-
D 3	-	-	negativ	-	-	<1:3,20-1:11,53	-	-
D 4	-	-	neg.-1:3,99	-	-	<1:3,94-1:37,43	-	-
E	-	<1:2,34-1:5,65	-	-	1:7,98-1:41,53	-	-	-
F	-	<1:2,88-1:3,99	-	-	1:5,65-1:23,05	-	-	-
G	-	neg.-<1:2,74	-	-	<1:7,48-1:20,76	-	-	-

4. Besprechung der Ergebnisse

Kaninchen sind für eine Wirksamkeitsprüfung von Aujeszky-Vaccinen aus inaktiviertem Virus nur unter ganz bestimmten Bedingungen geeignet. Sie scheinen nur dann eine solide Immunität gegen die Pseudowut zu entwickeln, wenn eine zweimalige Impfung erfolgt, wobei der Abstand zwischen den Impfungen nicht mehr als zwei Wochen betragen, und die anschließende Belastungsinfektion ebenfalls nicht später als zwei Wochen nach der letzten Impfung stattfinden sollte. Žuffa (89) und Delagneau et al. (20) benutzten sogar noch kürzere Zeitabstände. Žuffa (89) impfte die Tiere dreimal mit verschiedenen Applikationsdosissen innerhalb von neun Tagen und belastete sie kurz nach der letzten Impfung. Delagneau et al. (20) impften zweimal im Abstand von 10 Tagen und führten die Challenge-Infektion nach weiteren 10 Tagen durch. Die Einhaltung dieser kurzen Intervalle ist bisher eines der wichtigsten Kriterien für eine erfolgreiche Immunisierung von Kaninchen.

Ein zweiter, ebenfalls entscheidender Punkt ist die Wahl eines für Kaninchen geeigneten Adjuvans. Das Adjuvans unterstützt die antigene Wirkung eines Impfstoffes auf Grund seiner Depotwirkung und einer Steigerung der Oberflächenaktivität des Antigens, und möglicherweise wird durch Adjuvantien die Immunitätslage eines Individuums stimuliert (48).

Die bisher besten Ergebnisse wurden mit öligen Adjuvantien erzielt (20). Dieses Adjuvans war in den Versuchen in Vaccine B enthalten, mit der ein 100 %iger Schutz erreicht werden konnte. Aber auch bei der Verwendung von $Al(OH)_3$ - unter Berücksichtigung des zweiwöchigen Impfintervalls - konnten noch Schutzraten von 50 % bis 80 % erzielt werden. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Delagneau et al. (20), der 14 Kaninchen mit einer Vaccine, die $Al(OH)_3$ enthielt, impfte und sie anschließend einer Belastungsinfektion unterzog, die kein Tier überlebte. Žuffa (89) berichtete, daß 5 von 6 geimpften Kaninchen die Testinfektion überlebten.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse sprechen dafür, daß für die Immunogenität einer Vaccine nicht nur die Wahl des Adjuvans entscheidend ist, sondern daß die Art des Inaktivierungsvorgangs ebenso bedeutend ist. Möglicherweise hat sogar der Inaktivierungsvorgang einen Einfluß auf die Wirkung des Adjuvans.

In den vorliegenden Versuchen wurden die Vaccinen mittels Gamma-Bestrahlung inaktiviert, in den Versuchen von Delagneau et al. (20) und Žuffa (89) wurde zur Inaktivierung Glutar- bzw. Formaldehyd verwendet.

Von Herpes-simplex-Viren weiß man, daß sie nach Gamma-Bestrahlung ihre Vermehrungsfähigkeit verlieren, aber trotzdem sowohl die zelluläre als auch

die humorale Immunität stimulieren können (18). Dieses Verhalten gilt offensichtlich auch für das Pseudowutvirus.

Als ein weiterer, ebenfalls sehr entscheidender Punkt bezüglich Immunogenität hat sich die Wahl des Zellsystems, in dem das Virus vermehrt wurde, herausgestellt. Die Vaccinen C und D waren an embryonale Kälberlungenzellen adaptiert. Nachdem die Impfversuche mit diesen Vaccinen nicht die gewünschten Ergebnisse brachten, wurde für die Herstellung der anderen Vaccinen BHK-Zellkulturen verwendet.

Die bessere Wirksamkeit dieser Vaccinen ist sicher auch auf die vorher erwähnten Punkte, die für die Vaccinen C und D nur zum Teil zutreffen, zurückzuführen. Aber offensichtlich weisen auch Zellkulturen, die nichtembryonalen Ursprungs sind, ein ausgeprägtes immunogenes Verhalten auf. Dazu kommt, daß die embryonalen Kälberlungenzellen keine permanente Zell-Linie wie die BHK-Zellen sind, sondern immer neu gewonnen werden mußten, d.h. daß die Zellen von Ansatz zu Ansatz unterschiedlich sein können. Ein weiterer Gesichtspunkt ist, daß BHK-Zellen auf Grund ihrer Morphologie für die Erhaltung der immunogenen Eigenschaften des Pseudowutvirus besser geeignet sind. Herpesviren benötigen zur Fertigstellung ihrer Hülle Teile der Zellmembranen und gerade BHK-Zellen sind in der Lage, besonders antigenstarke Virushüllen zu produzieren.

Für alle bisher hergestellten Pseudowutvaccinen, die auch für Kaninchen wirksam sind, wurden Nierenzellen von Schweinen verwendet (14,20).

Die Bedeutung des Virusausgangsgehalts, abgesehen vom Mindestausgangsgehalt, hat auf den immunogenen Wert einer Vaccine offenbar keinen besonderen Einfluß. Die Ergebnisse, die mit den Vaccinen E bis I erzielt wurden, deren Virusausgangsgehalt zwischen $10^{6,25}$ - $10^{9,0}$ KID₅₀/ml lag, gleichen sich in etwa.

Im allgemeinen war der Zeitpunkt des Todes bei den geimpften Tieren nach der Testinfektion im Vergleich zu ungeimpften Kontrolltieren um 1 - 2 Tage verzögert. 3 Kaninchen, die mit Vaccine G geimpft wurden, starben erst 8 - 10 Tage nach der Testinfektion. Eines der mit Vaccine H geimpften Kaninchen (das einzige mit dieser Vaccine geimpfte Tier, das die Testinfektion nicht überlebte) erlag der Testinfektion erst nach 16 Tagen.

Daraus ergibt sich, daß auch in diesen Fällen durchaus eine gewisse Immunität vorhanden ist, die sich dann aber letztlich doch nicht gegen die Infektion durchsetzen konnte.

Über die Höhe der von den Impfstoffen produzierten neutralisierenden Antikörper kann generell gesagt werden, daß sie keinen Schluß auf den tatsächlichen Immunstatus der Impflinge zuläßt.

Da die geprüften Vaccinen unter optimalen Bedingungen im Durchschnitt 50 % bis 100 % der Kaninchen vor einer Testinfektion schützen, ist der Impfschutz für das hochempfindliche Kaninchen als gut zu bezeichnen und damit auch die Eignung dieser Tierart zur Wirksamkeitsprüfung von hochwirksamen Impfstoffen gegeben.

5. Zusammenfassung

Es sind 12 unterschiedlich hergestellte Aujeszky-Impfstoffe aus inaktiviertem Virus auf ihre Wirksamkeit und Unschädlichkeit im Kaninchen geprüft worden. Alle Vaccinen waren für das Kaninchen gut verträglich und unschädlich. Für die Wirksamkeitsprüfung sind Kaninchen nur dann geeignet, wenn folgende technische Voraussetzungen der Versuchsdurchführung eingehalten werden:

1. Zweimalige Impfung im Abstand von 2 Wochen,
2. Abstand zwischen letzter Impfung und Challenge-Infektion nicht länger als 2 Wochen,
3. Dosis der Testinfektion 50 - 100 KID₅₀/ml.

Die Wirksamkeit der Vaccinen im Kaninchen wird zudem beeinflusst durch:

1. Die Art des Adjuvans,
2. Die Art des für die Impfstoffproduktion benutzten Zellsystems.

Im Literaturteil wird ein umfassender Überblick über die bisherigen Impfversuche gegen die Aujeszky'sche Krankheit mit Lebendvaccinen und Vaccinen aus inaktivierten Erregern im Schwein, Kaninchen, Wiederkäuer und Fleischfresser gegeben.

Summary

Comparative investigations on the efficacy of differently produced vaccines from inactivated virus against Pseudorabies in rabbit.

Twelve differently produced Aujeszky-vaccines from inactivated viruses have been examined as to their efficacy and innocuous effect in rabbits. All the vaccines have proved to be harmless and innocuous to rabbits. Rabbits are only suitable for this efficacy test under the following technical conditions:

1. Two vaccinations with an interval of two weeks;
2. Interval between the last vaccination and the challenge-infection not more than two weeks;
3. Dose of challenge-infection 50 - 100 TCID₅₀/ml

The efficacy of the vaccines in the rabbit is additionally influenced by:

1. The kind of adjuvans;
2. The kind of tissue system used for the production of the vaccine.

In the argument with the past research on this subject a comprehensive survey is given of the tests of vaccination against Aujeszky-disease with live vaccines and vaccines from inactivated viruses in the pig, rabbit, sheep, cow, dog, and mink.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Airapetyan, V.G., A.B. Khachtryan,
M.S. Chobanyan, and K.A. Abelyan,
1969: Immunogenic properties of in-
activated vaccines against
Aujeszky's disease
Veterin. 1, 34 - 36
- 2) Akkermans, J.P.W.M., 1963: Aujeszky's disease in swine
Kongreßberichte des XVII. Welt-
tierärztekongresses
1, 689 - 690
- 3) Akkermans, J.P.W.M. 1969: Serum prophylaxis in the di-
sease of Aujeszky in pigs
Tijds. Diergeneesk.
94, 614 - 621
- 4) Andries, K., M. Pensaert,
H. van Lierde, J. Leunen,
F. Castryck, and P. de Roose,
1976: Vaccination of swine against
Aujeszky's disease with live
and inactivated vaccine
Vlaam diergeneesk.T.
45, 340 - 352
- 5) Bartha, A., 1962: Immunisierungsversuche mit dem
attenuierten Stamm "K" des Au-
jeszky-Virus
Magy Állatorv. Lap. 17, 321
- 6) Bartha, A., and J. Kojnok,
1963: Active immunization against
Aujeszky's disease
Kongreßberichte des XVII. Welt-
tierärztekongresses
1, 531 - 533
- 7) Becker, H.C., 1961: Die Aujeszky'sche Krankheit in
deutschen Schweinebeständen
Mh. Vet. Med. 16, 88 - 96
- 8) Bélády, J. und G. Ivánovics,
1954: Immunisierung von Laborato-
riumstieren mit dem Virus der
Aujeszky'schen Krankheit nach
dessen Inaktivierung mit
UV - Strahlen
Acta Microbiol. Hung. 2, 151-160

- 9) Laboratoire Roger Bellon
Département vétérinaire
159 Avenue du Roule
92201 Neuilly S/Seine France
Impfstoff-Prüfungsvorschriften

- 10) Berbinschi, C. und M. Papadopol
1965:
Studie über die immunogenen
Eigenschaften der saponinhal-
tigen Aujeszky-Vakzine, herge-
stellt aus Kulturvirus
Lucrările Inst. Pasteur
4, 19 - 26

- 11) Berbinschi, C., M. Papadopol
und M. Marta, 1968:
Untersuchungen über den pro-
phylaktischen Wert der inak-
tivierte Aujeszkyvakzine in
Schweinezuchtbetrieben
Arch. vet. 5, 107 - 114

- 12) Bertarelli, E. und C. Melli,
1913:
Experimentelle Untersuchungen
über die Pseudolyssa
Zbl. Bakt. Orig. 71, 286 - 291

- 13) Bognár, K. und G. Kucsera,
1966:
Untersuchungen mit schwach vi-
rulenter Aujeszky-Vakzine
Acta vet. hung. 16, 73 - 82

- 14) Borgen, H.C., and L. Espensen,
1970:
Immunizing effect of photoinac-
tivated Pseudorabies virus
Zbl. Bak. I. Orig.
214, 13 - 16

- 15) Bran, L., I. Suhaci und
R. Ursache, 1965:
Untersuchungen über die spez.
Prophylaxe der Aujeszky'schen
Krankheit bei Schweinen
Arch. vet. 1, 19 - 35

- 16) Bran, L., I. Suhaci und
R. Ursache, 1966:
Das Verhalten von Säuen in der
letzten Trächtigkeitsphase und
in der ersten der Laktation,
sowie der neugeborenen Ferkel
nach Impfung gegen die Aujesz-
ky'sche Krankheit mit aviani-
sierter Virusvaccine
Lucrările Inst. Pasteur
4, 3 - 17

- 17) Bran, L., I. Suhaci, R. Ursache,
C. Berbinschi, and M. Papadopol,
1969:
Investigations on the immunizing value in piglets of the attenuated Pseudorabies vaccine by comparison with that of the inactivated saponine - added vaccine
Arch. vet. 5, 15 - 27
- 18) Christensen, R.C., R.N. Lausch,
S.C.St. Jeor, and F. Rapp,
1978:
Survival and immunological characteristics of gamma-irradiated herpesviruses
Int. J. Radiat. Biol. 33, 511 - 516
- 19) Dahme E. und E. Weiß,
1968:
Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- 20) Delagneau, J.F., B. Toma,
P. Vannier, R. Loquerie,
P. Prunet et J.P. Tillon,
1975:
Immunisation contre la maladie d'Aujeszky a l'aide d'un nouveau vaccin huileux a virus inactivé
Rec. Med. Vet. 151, 567 - 575
- 21) Dilovski, M., 1969:
Über die UV - Inaktivierung des Aujeszky-Virus
Zbl. Vet. Med. B 16, 346 - 352
- 22) Dilovski, M., 1972:
Der Einfluß der ionisierenden Bestrahlung auf Tierviren
I. Gammaaktivierung des Aujeszky-Virus
Zbl. Vet. Med. B 19, 128 - 135
- 23) Dilovski, M., 1973:
Der Einfluß der ionisierenden Bestrahlung auf Tierviren
II. Die Wirkung einer subletalen Dosis von Gammastrahlen auf die Vermehrung des Aujeszky-Virus
Zbl. Vet. Med. B 20, 250 - 255

- 24) Ercegovac, D., 1960:
Beitrag zur Kenntnis der Produktions- und Wertbestimmungsmethode der Vakzine gegen die Aujeszky'sche Krankheit
Acta vet. Beograd, 10, 27 - 35
- 25) Frescura, T. ed A. Fioroni, 1971:
Controllo di efficacia di un vaccino contro la Pseudorabbia (Malattia di Aujeszky)
Vet. Ital. 22, 374 - 387
- 26) Frescura, T., P. Vivoli, P. Cardaras, L. Battistacci ed A. Morozzi, 1977:
Inattivazione del virus di Aujeszky con beta-propiolattone e preparazione di un vaccino oleoso per l'immunizzazione dei cani
Clin. vet. 100, 499 - 505
- 27) Gasparin, J. und W. Lüpcke, 1978:
Erfahrungen beim befristeten Einsatz von Aujeszky-Lebendimpfstoff "Dessau"
Mh. Vet-Med. 33, 548 - 550
- 28) Haralambiev, H., K. Mermerski, S. Simeonov, M. Jotov, I. Stoev, K. Dimitrov und I. Nikolov, 1967:
Untersuchungen über die Immunogenität der mit Äthanol inaktivierten Vakzine gegen die Aujeszky'sche Krankheit
Arch. Exp. Vet.Med. 21, 501 - 507
- 29) Hurst, W.E., 1933:
Studies on Pseudorabies (infectious bulbar paralysis, mad itch)
I. Histology of the disease, with a note on the symptomology
J. Exp. Med. 63, 415 - 434
- 30) Hussel, L., R. Neubert und A. Liebisch, 1963:
Über Aujeszky'sche Krankheit in Schweinebeständen
Mh. Vet. Med. 18, 177 - 181

- 31) Idrisov, G. Z. 1972:
Morphology of immune responses (of pigs) to aerosol vaccination against Aujeszky's disease
Veterin. 2, 33 - 36
- 32) Ivaničová, S., R. Škoda, V. Mayer, and F. Sokol, 1963:
Inactivation of Aujeszky disease (Pseudorabies) virus by nitrous acid
Acta virol. 7, 7 - 15
- 33) Jakubik, J., 1977:
Comparative susceptibility of rabbits, rats, mice, and pigs to infection with Aujeszky disease virus (ADV) in the development of an efficacy test for vaccines
Zbl. Vet. Med. B 24, 764 - 766
- 34) Jakubik, J., G. Wittmann und R. Škoda, 1975:
Immunisierung von Kälbern mit der EEI/DEAE-Dextran-Vakzine gegen die Aujeszky'sche Krankheit
Zbl. Vet. Med. B 22, 827 - 832
- 35) Jamrichová, O., and R. Škoda, 1969:
Multiplication and distribution of attenuated Pseudorabies virus in the organism of vaccinated pigs
Acta virol. 13, 42 - 51
- 36) Jamrichová, O., A. Sokol, and A. Ševčík, 1971:
Distribution of attenuated vaccine strains of Pseudorabies virus in intraperitoneally infected swine foetuses
Acta virol. 15, 286 - 292
- 37) Jentzsch, K.D. und E. Apostoloff, 1970:
Zur Frage der Empfänglichkeit des Menschen für das Herpesvirus suis (Aujeszky-Virus)
Z. ges. Hyg. 16, 692 - 696

- 38) Kabelík, V. und B. Korych, 1966:
Möglichkeiten der Kultivierung des Aujeszkyvirus in der stabilen Zell-Linie des Kortex der Schweineniere (PK - Linie)
Arch. Exp. Vet. Med. 20, 935 - 946
- 39) Kärber, G., 1931:
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche
Arch. exp. Path. Pharmac. 162, 480
- 40) Koch, A. und E. Abrahám, 1952:
Immunisationsversuche mit dem Aujeszky'schen Virus
Acta vet. hung. 2, 271 - 279
- 41) Kretzschmar, C., 1973:
Zum Wert der aktiven Immunisierung mit Lebendimpfstoff bei der Sanierung der Bestände von Aujeszky'scher Krankheit
Mh. Vet. Med. 24, 927 - 931
- 42) Lomniczi, B., 1974:
Biological properties of Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus strains with special regard to interferon production and interferon sensitivity
Arch. Virus F. 44, 205 - 214
- 43) Madin, S.H., P.C. Andriese, and B.N. Darby, 1957:
The in vitro cultivation of tissues of domestic and laboratory animals
Am. J. vet. Res. 18, 932
- 44) Manninger, P. und A. Marcis, 1937:
Versuche mit dem Erreger der Aujeszky'schen Krankheit
Zschr. Inf. Krankh. Haust. 51, 25 - 32

- 45) Mašić, M., 1959:
Our serum against Aujeszky's disease
Acta vet. Beograd 9, 41 - 50
- 46) Mašić, M., M. Ercegan
und M. Petrović, 1963:
Die Bedeutung der Tonsillen
für die Pathogenese und Diagnose
der Aujeszky'schen Krankheit bei Schweinen
Zbl. Vet. Med. B 12, 398 - 405
- 47) Mašić, M., M. Petrović
und B. Dobrenoy, 1965:
Untersuchungen über die Virämie
bei der Aujeszky'schen Krankheit
Zbl. Vet. Med. B 12, 406 - 411
- 48) Mayr, A., P.A. Bachmann,
B. Bibrack und G. Wittmann,
1974:
Virologische Arbeitsmethoden
Bd. I
Verlag G.Fischer: Stuttgart
- 49) Mayr, A., P.A. Bachmann,
B. Bibrack und G. Wittmann,
1977:
Virologische Arbeitsmethoden
Bd. II
Verlag G. Fischer: Stuttgart
- 50) Mc Ferran, J.B., and C. Dow,
1965:
The distribution of the virus
of Aujeszky's disease (Pseudo-
rabies) virus in experimentally
infected swine
Am. J. Vet. Res. 26, 631 - 635
- 51) Mc Ferran, J.B., and C. Dow,
1973:
The effect of colostrum derived
antibody on mortality and virus
excretion following experimental
infection of piglets with Aujeszky's disease
virus
Res. vet. Sci. 15, 208 - 214
- 52) Mc Ferran, J.B., and C. Dow,
1975:
Studies on immunisation of
pigs with the Bartha strain
of Aujeszky's disease virus
Res. vet. Sci. 19, 17 - 22

- 53) Nedjalkov, St., St. Stoitshev,
B. Ribarov und N. Stoilova,
1968:
Versuche zur Herstellung von
Vakzine gegen die Aujeszky-
sche Krankheit aus inaktivier-
tem Virus
Arch. Exp. Vet. Med. 22,
499 - 507
- 54) Nedjalkov, St., B. Ribarov,
N. Stoilova, N. Gawrilov
und K. Mermerski, 1970:
Versuche zur Gewinnung einer
kombinierten Kristallviolett-
vakzine gegen Schweinepest und
Aujeszky'sche Krankheit
Arch. Exp. Vet. Med. 24,
159 - 165
- 55) Nedjalkov, St., N. Stoilova,
B. Ribarov und B. Tabakov,
1972:
Zur Immunität von Saugfer-
keln nach Impfung mit Adsor-
batkristallviolettvakzine ge-
gen die Aujeszky'sche Krank-
heit
Arch. Exp. Vet. Med. 26,
257 - 262
- 56) Neukirch, M. und K. Bauer,
1977:
Möglichkeiten der Vakzinie-
rung mit inaktiviertem Vi-
rus über den Respirations-
trakt untersucht am System
Aujeszky-Virus-weiße Maus
Zbl. Vet. Med. B 24, 63 - 74
- 57) Nieberle / Cohrs, 1970:
Lehrbuch der speziellen pa-
thologischen Anatomie der
Haustiere
Verlag G. Fischer, Jena
5. Auflage
- 58) Osdize, D.F., and
V. T. Nochevnyi, 1972:
Tissue culture aluminium
hydroxide vaccine against
Aujeszky's disease
Veterin. 3, 42 - 44
- 59) Röhrer, H., 1969:
Handbuch der Virusinfektio-
nen bei Tieren, Bd. IV,
spez. Teil 3
Verlag G. Fischer, Jena 1969

- 60) Rondhuis, P.R.,
R. M. S. Wirahadiredja, J.P.W.M.
Akermans, and J. Jakubik,
1978:
Challenge experiments with the
virus of Aujeszky's disease
in nonvaccinated and vaccina-
ted sheep
Zbl. Vet. Med. B 25, 70 - 80
- 61) Russeff, C. und V. Matewa,
1962:
Titrierung von Anti-Aujeszky-
Sera in Gewebekulturen
Arch. Exp. Med. Vet. 16,
225 - 228
- 62) Russeff, C. und V. Matewa,
1962:
Serienweises Kultivieren des
Aujeszky-Virus in Gewebekultu-
ren von Hühnerembryonen
Arch. Exp. Vet. Med. 16,
137 - 142
- 63) Sabó, A., and D. Blaskovič,
1970:
Resistance of pig tonsillary
and throat musosa to reinfec-
tion with a homologous Pseu-
dorabies virus strain
Acta virol. 14, 17 - 24
- 64) Sabó, A., and Z. Grunert,
1971:
Persistence of virulent
Pseudorabies virus in herds
of vaccinated and nonvacci-
nated pigs
Acta virol. 15, 87 - 94
- 65) Sacco, T.F. ed E. Maglione,
1968:
La diagnosi di malattia di
Aujeszky per mezzo degli an-
ticorpi fluorescenti
Ann. Fac. Med. Vet. Torino 17,
335 - 343
- 66) Sacco, T.F., E. Maglione,
C. Ginanni e B. Micheletto,
1972:
Contributo alla conoscenza del-
la patogenesi della malattia
di Aujeszky nel suino
Ann. Fac. Med.Vet. Torino 19,
149 - 153
- 67) Simeonov, S., V. Vasilev,
M. Iotov, and K. Mermerski,
1971:
Improvement of ethanol vacci-
ne against Aujeszky's disease
I. Production of an ethanol-
saponin vaccine
Veterinarnomeditsinski Nauki 8,
23 - 29

- 68) Škoda, R. 1962:
A modified Pseudorabies virus suitable for immunization of cattle
Acta virol. 6, 189
- 69) Škoda, R., 1966:
Immunisierung gegen die Aujeszky'sche Krankheit mit Lebend-Vakzine
Vet. Med. 11, 85 - 95
- 70) Škoda, R., I. Brauner, E. Sádecký, and V. Mayer, 1964:
Immunization against Aujeszky's disease with live vaccine
I. Attenuation of virus and some properties of attenuated strains
Acta virol. 8, 1 - 9
- 71) Škoda, R., I. Brauner, E. Sádecký, and J. Somogyiová, 1964:
Immunization against Aujeszky's disease with live vaccine
II. Immunization of pigs under laboratory conditions
Acta virol. 8, 123 - 124
- 72) Škoda, R. und Z. Grunert, 1965:
Epizootologie der Aujeszky'schen Krankheit in der CSSR
1. Geschichte des Vorkommens und geographische Verbreitung
Arch. Exp. Vet. Med. 19, 577-585
- 73) Škoda, R., Z. Grunert und J. Zubai, 1970:
Epizootologie der Aujeszky'schen Krankheit in der CSSR
3. Beeinflussung des Vorkommens der Seuche durch Massimpfung der Schweine mit Lebendvirusvakzinen
Arch. Exp. Vet. Med. 24, 167 - 177
- 74) Škoda, R. und J. Jakubik, 1972:
Komplementbindungsreaktion bei der Aujeszky'schen Krankheit
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 20, 387 - 392

- 75) Škoda, R., E. Sádecký und J. Molnár, 1963:
Über die bei Mutterschweinen nach natürlicher Infektion serologisch nachweisbare Immunität gegen die Aujeszzkysche Krankheit
Arch. Exp. Vet.Med. 13, 1363-1370
- 76) Škoda, R. und G. Wittmann, 1973:
Immunisierung von Schweinen mit Vakzinen aus inaktiviertem Aujeszky-Virus
Zbl. Med. B 20, 127 - 138
- 77) Škoda, R. und A. Žuffa, 1962:
Die Diagnostik der Aujeszzkyschen Krankheit auf Gewebekulturen
Arch. Exp. Med.Vet. 16, 491 - 499
- 78) Spearman, C. 1931:
(zitiert nach Kärber, G.)
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche
Arch. exp. Path. Phamak. 162, 480
- 79) Suhaci, I., M. Papadopol, I. Cirstet und G. Dumitrescu, 1972:
Abschwächungsversuche des Aujeszky-Virus-Stammes Bucuresti durch wiederholte Passagierungen an Hühnerembryo-fibroblastenkulturen
Arch. vet. 9, 127 - 142
- 80) Surján, J., and J. Kojnok, 1966:
Fluctuations in serum protein composition and serum antibody level of pigs hyperimmunized with Aujeszky's disease virus
Acta vet. hung.16, 159 - 166
- 81) Thurber, E.T., 1977:
A new modified live virus vaccine for prevention of Pseudorabies
Norden News, Summer 1977 Norden Laboratories, USA, 10 - 15

- 82) Vesselinova, A. und G. Tatarov, 1973:
Pathomorphologische Untersuchungen an experimentell mit einem Impfstamm von Herpesum Virus infizierten Ferkeln
Zbl. Vet.Med. B, 20, 533 - 539
- 83) Willemse, A., P.R. Rondhuis, S.A. Goedegebuure, and J.H.M. Maas, 1977:
An atypical form of Aujeszky's disease after vaccination
Tijds. Diergeneesk. 102, 386 - 388
- 84) Wittmann, G., 1976:
Cell-mediated immunity in Aujeszky disease virus infected pigs
II. Influence of lymphocytes on macrophage migration
Zbl. Vet.Med. B 23, 520 - 528
- 85) Wittmann, G., G. Bartenbach und J. Jakubik, 1966:
Cell-mediated immunity in Aujeszky's disease virus infected pigs
I. Lymphocyte stimulation
Arch. Virus F. 50, 215 - 222
- 86) Wittmann, G. und J. Jakubik, 1977:
Frühstadium der Immunität nach Impfung von Ferkeln mit einer inaktivierten Aujeszky-Virus-Vakzine
Zbl. Vet.Med. B 24, 569 - 575
- 87) Žuffa, A., 1963:
Modified virus of Aujeszky's disease suitable for immunization purposes
Folia mikrobiol. 8, 190
- 88) Žuffa, A., 1963:
Immunisierung gegen die Aujeszky'sche Krankheit
I. Gewinnung des modifizierten Virus der Aujeszky'schen Krankheit
Arch. Exp. Vet.Med. 17, 1325-1344

- 89) Žuffa, A., 1963:
Versuch zur Immunisierung von
Laboratoriumstieren und Schwe-
nen mittels Formaldehyd- und
UV-Strahlen-inaktivierten
Aujeszky-Virus
Arch. Exp. Vet.Med. 17, 595 - 613
- 90) Žuffa, A., 1963:
Das modifizierte Virus der Au-
jeszky'schen Krankheit und die
Möglichkeiten seiner Anwen-
dung zur Immunisation der
Haustiere
Kongreßberichte des XVII. Welt-
tierärztekongresses 1, 565-569
- 91) Žuffa, A., 1964:
Immunisierung gegen die Au-
jeszkysche Krankheit
III. Impfung der Mutterschweine
mit dem modifizierten Virus mit
besonderer Beachtung der dia-
plazentaren Übertragung des Vi-
rus und der kolostralen Über-
tragung der Antikörper
Zbl.Bak. I Abt.Orig. 192, 280-287
- 92) Žuffa, A., 1964:
Immunisierung gegen die Au-
jeszkysche Krankheit
IV. Einige immunologische Eigen-
schaften des modifizierten Vi-
rus der Aujeszky'schen Krankheit
Arch. Exp. Vet.Med. 18, 1099 -
1177
- 93) Žuffa, A., 1966:
Immunization against Aujeszky's
disease
VII. The use of a further mo-
dified virus for preventive
vaccination of sheep
Zbl.Bakt.I Orig. 201, 423-431
- 94) Žuffa, A., 1972:
Immunogenicity of the avirulent
clone BUK-TK-300/9,2 of the
Aujeszky's (Pseudorabies) virus
in sheep
Acta vet. Brno 41, 67 - 74

- 95) Žuffa, A., I. Banda, and J. Konrád, 1972:
-
Combined vaccination of mink against Aujeszky's disease and Botulism
Zbl. Vet.Med. B 19, 728 - 738
- 96) Žuffa, A. und V. Dlhý, 1964:
Immunisierung gegen die Aujeszky'sche Krankheit
VI. Vakzinierung von Rindern mit dem modifizierten Virus der Aujeszky'schen Krankheit
Mh. Med.Vet. 21, 801 - 803
- 97) Žuffa, A. und K. Grigelová, 1966:
Immunisierung gegen die Aujeszky'sche Krankheit
II. Studium der Zytopathogenität und Plaquemorphologie verschiedener Virusstämme bezüglich ihrer Virulenz für Schweine
Arch. Exp. Vet.Med. 20, 127 - 140
- 98) Žuffa, A., und J. Matis, 1970:
The loss of antigenicity of Aujeszky's disease virus inactivated by heating in the presence of Mg_2Cl
Vet. Čas. 13, 101 - 109
- 99) Žuffa, A. und A.R. Neurath, 1962:
Formaldehyd-Inaktivierung von Pseudorabies (Aujeszky)-Virus
Arch. Exp. Vet.Med. 16, 11 - 17

Lebenslauf

Am 17. Januar 1950 wurde ich, Karin Aigner-Dünzl, als einziges Kind des Finanzbeamten Max Aigner und seiner Ehefrau Gertraud Aigner, geb. Fahrmeir in München geboren.

Von 1956 - 1960 besuchte ich die Volksschule in Berchtesgaden; von dort wechselte ich auf das Realgymnasium Berchtesgaden. Ab 1963, nach dem Tod meines Vaters, besuchte ich das Karls-Gymnasium in München-Pasing. 1970 legte ich das Abitur ab.

Im Wintersemester 1970/71 studierte ich Zeitungswissenschaften, Physik und Geographie. Nach Erhalt eines Studienplatzes studierte ich ab dem Wintersemester 1971/72 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Veterinärmedizin und legte am 28. Februar 77 das Staatsexamen ab.

Die Approbation als Tierärztin erhielt ich am 25. März 1977.

Am 31. August 1976 habe ich mich mit dem Studienreferendar Peter Dünzl verheiratet und führe seitdem den Namen Aigner-Dünzl.

Mit der vorliegenden Arbeit habe ich im Juni 1977 begonnen.

Seit dem 20. November 1978 bin ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs, Fachbereich Tiermedizin, angestellt.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr danke ich
sehr herzlich für die freundliche Überlassung
des Themas und für seine jederzeit gern ge-
währte Hilfe und Unterstützung, die die Fer-
tigstellung der Dissertation ermöglicht haben.

